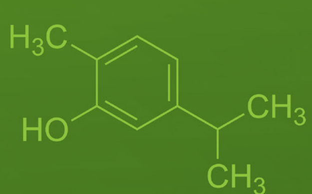
EFEITO CARDIOPROTETOR DO COMPLEXO DE INCLUSÃO CARVACROL/BETACICLODEXTRINA NA LESÃO DE REPERFUSÃO CARDÍACA

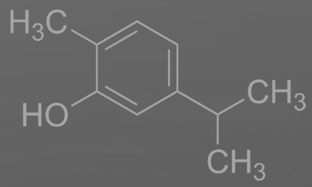
FRANCIELLE FEITOSA DIAS SANTOS
SANDRA LAUTON SANTOS
ENILTON APARECIDO CAMARGO



Atena Editora
Ano 2023

EFEITO CARDIOPROTETOR DO COMPLEXO DE INCLUSÃO CARVACROL/BETACICLODEXTRINA NA LESÃO DE REPERFUSÃO CARDÍACA

FRANCIELLE FEITOSA DIAS SANTOS
SANDRA LAUTON SANTOS
ENILTON APARECIDO CAMARGO



Atena Editora
Ano 2023

Editora chefe
Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
Editora executiva
Natalia Oliveira
Assistente editorial
Flávia Roberta Barão
Bibliotecária
Janaina Ramos
Projeto gráfico
Camila Alves de Cremo
Luiza Alves Batista
Fernanda Jasinski
Imagens da capa
iStock
Edição de arte
Luiza Alves Batista

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Efeito cardioprotetor do complexo de inclusão Carvacrol/B-Ciclodextrina na lesão de reperfusão cardíaca

Diagramação: Natália Sandrini de Azevedo
Correção: Soellen de Britto
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores

Autores: Francielle Feitosa Dias Santos
Sandra Lauton Santos
Enilton Aparecido Camargo

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S237 Santos, Francielle Feitosa Dias
Efeito cardioprotetor do complexo de inclusão Carvacrol/B-Ciclodextrina na lesão de reperfusão cardíaca / Francielle Feitosa Dias Santos, Sandra Lauton Santos, Enilton Aparecido Camargo. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2023.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-258-1269-4
DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.694230903

1. Cardiologia. I. Santos, Francielle Feitosa Dias. II. Santos, Sandra Lauton. III. Camargo, Enilton Aparecido. IV. Título.

CDD 616.12

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

"Dedico esta obra a Deus, aos meus pais, ao meu esposo e aos pacientes que poderão se beneficiar com as propriedades terapêuticas do Carvacrol a partir dos avanços científicos e tecnológicos da indústria farmacêutica".

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, saúde e sabedoria que me concede a cada dia, bem como, a fortaleza, discernimento e perseverança na fé.

Aos meus pais – Janete Feitosa Dias Santos e Givaldo Lidio dos Santos, e meu esposo Adenilson Correia Santos Júnior, pessoas essenciais na minha vida. Agradeço pelo incentivo, apoio, força, oração, amor e companheirismo.

A Universidade Federal de Sergipe (UFS), instituição de ensino superior responsável pela minha formação acadêmica nos níveis de graduação (Fonoaudiologia) e de pós-graduação *strictu sensu* (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Mestrado) – tenho orgulho em ser fruto da UFS.

A minha orientadora, a Profª Dra Sandra Lauton Santos, pela oportunidade de me guiar durante o percurso da pós-graduação *strictu sensu,* algo que eu sempre almejei. Desejo que continue se dedicando no exercício da sua carreira docente e científica.

Ao meu coorientador, o Prof. Dr. Enilton Aparecido Camargo, gratidão pela tranquilidade e serenidade que transmite aos alunos.

Aos animais, sem eles os experimentos não seriam possíveis e este trabalho não teria como se concretizar.

A colega Profª Dra Paula Menezes e ao Prof. Dr. Adriano Antunes, do Departamento de Farmácia da UFS, pela parceria e realização da complexação do carvacrol à β-Ciclodextrina.

Ao Dr. Silvan Araújo e ao Prof. Dr. Charles Estevam, Laboratório de Bioquímica e Química de Produtos Naturais, pela parceria e por possibilitar a execução de outro método de avaliação da atividade antioxidante *in vitro.*

Aos demais amigos e familiares, obrigada pelo apoio.

Os óleos essenciais são empregados e explorados pela humanidade há cerca de 3 milênios e meio em diferentes ramos comerciais, mas principalmente na perfumaria e cosméticos. Essas substâncias enfatizam a qualidade sensorial dos alimentos tendo então significativa aplicabilidade na indústria alimentícia. No Brasil há uma ampla diversidade na flora, contendo múltiplas espécies vegetais, riqueza que fornece uma abundante extração de óleos essenciais obtidos da flora nativa – como, por exemplo, o óleo essencial de andiroba, cajá, copaíba, cupuaçu – muito utilizados na medicina popular.

A origem da lesão de reperfusão cardíaca é explicada pelo paradoxo do oxigênio e pela sobrecarga de cálcio intracelular. Estes eventos causam danos teciduais que comprometem o funcionamento do miocárdio. O carvacrol (CAR), monoterpeno fenólico com atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante, pode ser uma importante ferramenta de intervenção para a prevenção de lesões isquêmicas cardíacas. A β-ciclodextrina (β-CD) tem sido utilizada em complexos de inclusão para estabilizar moléculas instáveis, sendo assim utilizada neste estudo para aumentar a solubilidade do Carvacrol e reduzir a sua volatilidade. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial cardioprotetor do complexo de inclusão carvacrol/β-ciclodextrina (CAR/β-CD) na prevenção dos danos provocados pelas lesões de reperfusão na função cardíaca.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

O carvacrol (CAR) foi estudado neste trabalho com o propósito de contribuir para a ciência no campo de pesquisa de novas drogas cardioprotetoras. Estas podem ser estudadas em futuros ensaios clínicos, que busquem investigar a redução dos danos provocados pela lesão de reperfusão cardíaca, por exemplo, administração do CAR antes de uma cirurgia de angioplastia eletiva.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, em seu último relatório global sobre doenças não transmissíveis, as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo, e, nos últimos anos, foi reduzida drasticamente nos países desenvolvidos. Porém, ainda precisa ser reduzida nos países de baixa e média rendas, tornando-se meta mundial (WHO, 2014).

De acordo com o Data SUS (2015) as internações no Sistema Único de Saúde (SUS), por doenças cardiovasculares, compreenderam cerca de 516.163, cujo valor gasto com esses pacientes foi de R$ 1.593.806.957,52 e o número de óbitos atingiu 41.357 indivíduos, representando um alto custo e um grande problema de saúde pública.

Dados epidemiológicos mostram que as doenças cardiovasculares constituem a principal causa de morbidade, incapacidade e morte no Brasil e no mundo. Devido à alta prevalência da Síndrome Coronariana Aguda (SCA) e sua importância como causa de morbi-mortalidade no Brasil, o Ministério da Saúde criou a *Linha de Cuidado do Infarto Agudo do Miocárdio e o Protocolo de Síndromes Coronarianas Agudas* através da Portaria nº 2.994/2011 (BRASIL, 2011).

Segundo a Bocchi et al (2009), o tratamento das doenças cardiovasculares é realizado através de fármacos, atividades físicas, controle nutricional e cirúrgico. A cirurgia de revascularização do miocárdio tem demonstrado ser um procedimento seguro e bem estabelecido para o tratamento da insuficiência coronariana, incluindo os pacientes octogenários, pois proporciona o prolongamento e melhora da qualidade de vida desses pacientes. Mesmo com os índices baixos de mortalidade hospitalar, a morbidade pós-operatória se mantém, principalmente nos pacientes com doenças associadas (LAPAR et al, 2011).

Dentre as doenças cardiovasculares está o infarto agudo do miocárdio (IAM), evento ocasionado pela obstrução ao fluxo sanguíneo, geralmente por placa aterosclerótica ou trombo, provocando hipóxia, redução da oferta de oxigênio (O_2). O tecido localizado após a obstrução não recebe irrigação sanguínea e passa a ocorrer isquemia. Na lesão isquêmica, o tecido fica privado de O_2 e nutrientes, e necessita de outra fonte de energia para manter a viabilidade celular, além disso, ocorre uma sobrecarga intracelular de cálcio. A falta de O_2

compromete a fosforilação oxidativa mitocondrial e como consequência, a célula perde a principal fonte de produção de energia, adenosina trifosfato (ATP). Para suprir a demanda de ATP, a via glicolítica anaeróbica é incrementada, gerando acúmulo de lactato e de íons hidrogênio (KRIEGER, 2008).

Além dessas etapas e modificações na maquinaria celular durante a isquemia, os cardiomiócitos em processo isquêmico produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), que danificam os ácidos graxos que compõem os fosfolipídios das membranas. Essas alterações provocam um aumento progressivo da permeabilidade da membrana plasmática, alterações graves nos eletrólitos intracelulares, podendo desencadear a ruptura física da membrana celular, levando a resposta inflamatória aguda que pode prejudicar as células adjacentes (KRIEGER, 2008).

A lesão por reperfusão cardíaca é um fenômeno fisiopatológico, que consiste na perda da homestase intracelular, devido à redução ou ausência do oxigênio por insuficiência do suprimento sanguíneo, onde com a desobstrução do fluxo vascular, a célula cardíaca em processo de isquemia recebe uma concentração elevada de O_2 e cálcio (Ca^{+2}), bem como, entra em contrato com as EROs que promovem degradação lipídica e proteica (ARTIGOU, 1993).

Esta lesão de reperfusão cardíaca pode ocorrer em síndromes coronarianas, em geral, infarto do miocárdio, assim como, em cirurgias cardiovasculares e angioplastias eletivas. A lesão de reperfusão é responsável por 50% do tamanho do infarto, tornando-se um alvo natural para a investigação sobre a proteção cardíaca (BRASILEIRO, 1997).

O fenômeno da lesão de reperfusão vem chamando a atenção de pesquisadores por suas evidentes e importantes repercussões na prática clínica-cardiológica, e tem levado a uma melhor compreensão dos eventos a ele relacionados, em particular, a partir das EROs, que se formam nas obstruções ao fluxo coronariano, e que podem causar a lesão após a desobstrução vascular. Estas espécies reativas compreendem o ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que podem ser removidos das células por sistemas de enzimas com funções antioxidantes, normalmente presentes na fisiologia miocárdica. Esses sistemas de enzimas endógenas com ação antioxidante como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPX), são responsáveis pela limitação do acúmulo intracelular de O_2^- e H_2O_2 durante o metabolismo normal, seja por inibir sua formação ou por carrear da célula essas espécies reativas, reduzindo o dano oxidativo sobre as proteínas e lipídeos (ISKESEN et al, 2006).

Com o enfoque de melhorar a proteção miocárdica durante procedimentos que envolvam lesão de reperfusão, voltaram-se as atenções para a pesquisa de drogas citoprotetoras com ação em segmentos do metabolismo celular, utilizadas isoladamente

ou em associação, para reduzir ou prevenir o dano sobre a célula cardíaca (PARANG et al, 2005).

Nesse contexto, drogas derivadas de produtos naturais podem apresentar-se como substâncias com efeitos terapêuticos e então, caracterizarem-se por ter um potencial farmacêutico. O CAR, 2-metil-5-isopropilfenol é um monoterpeno fenólico, presente em óleos essenciais produzidos por numerosas plantas aromáticas e espécies da família *Lamiaceae*, incluindo o gênero *Origanum* e *Thymus.* Algumas ações biológicas do CAR são conhecidas como atividade antioxidante, anti-inflamatória, antinociceptiva, antimicrobiana e antitumoral, bem como, aditivo alimentar com função de conservante (BASER, 2008; GUIMARÃES et al, 2010; ALPHEN et al, 2012; DEL RÉ & JORGE, 2012; YU, LIU, ZHU, 2013; SOBRAL et al, 2014).

O CAR é um óleo com elevada viscosidade e volatilidade, além disso, apresenta baixa solubilidade. Existem diversos métodos farmacêuticos que buscam melhorar características físicoquímicas de compostos lipossolúveis, como a solubilidade e volatilidade. Dentre esses métodos está à formação de complexo de inclusão, normalmente realizada com as ciclodextrinas (CD), oligossacarídeos cíclicos.

A β-CD é um tipo de ciclodextrina bastante utilizada em formulações que resultem em preparações mais estáveis e melhoras terapêuticas. A incorporação das ciclodextrinas em sistemas farmacêuticos constitui uma realidade consolidada. Na área farmacêutica, a β-CD é um excipiente que tem sido explorado principalmente no incremento da solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade de medicamentos (SZEJTLI, 2005; CUNHA-FILHO & SÁ-BARRETO, 2007).

Há diversos medicamentos atualmente disponíveis no mercado mundial contendo β-CD, como benexate, omeprazol, antiulcerogênicos; dexametasona, ácido tiaprofênico, analgésicos; nimensulida, piroxicam, antiinflamatórios; cefalosporina, antibiótico; clordiazépoxido, ansiolítico; nitroglicerina, dilatador coronário (CUNHA-FILHO & SÁ-BARRETO, 2007).

Neste estudo, a nossa proposta foi de utilizar o complexo de inclusão do carvacrol à β-CD (CAR/β-CD) para avaliar a diferença terapêutica no tratamento prévio à lesão de isquemia cardíaca global seguida de reperfusão *ex vivo,* quando comparado ao efeito do pré-tratamento com o carvacrol livre. A nossa hipótese foi que o CAR/β-CD apresentasse melhores resultados biológicos que o CAR no modelo estudado, com a premissa de que este complexo de inclusão promova redução da volatilidade, aumento da solubilidade e melhora na biodisponibilidade.

DOENÇAS CARDIOVASCULARES

A doença arterial coronariana associada com infarto do miocárdio continua a sendo uma das principais causas de morte e morbidade em todo o mundo, apesar de avanços significativos na terapia. Estes avanços incluem angioplastias coronarianas com implante de *stent* e cirurgias de revascularização do miocárdio. No entanto, pacientes que possuem áreas com infarto do miocárdio estão em maior risco de insuficiência cardíaca progressiva e morte (PRATIK et al, 2014).

A alta prevalência da cardiopatia isquêmica crônica determina elevado consumo de recursos no tratamento e reabilitação. No ano de 2003, o SUS financiou a realização de 30.666 angioplastias coronarianas com implante de *stent* e 19.909 cirurgias de revascularização do miocárdio, totalizando aproximadamente 281 milhões de reais (ARAÚJO & FERRAZ; 2005).

Doença cardíaca isquêmica (DCI) é a maior causa isolada de mortalidade e perda de anos de vida ajustados por incapacidade em todo o mundo, sendo responsável por cerca de 7 milhões de mortes e 129 milhões de perda de anos de vida ajustados por incapacidade anualmente. A doença cardiovascular exerce um gasto econômico significativo, cuja projeção é em média 47 trilhões de dólares em perdas econômicas com doenças não transmissíveis para os próximos 20 anos (VEDANTHAN et al, 2014).

A transição epidemiológica fornece uma estrutura útil para compreender a origem da doença cardíaca isquêmica em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (Figura 1). A transição epidemiológica passou por vários períodos que engloba as condições mundiais de saúde. Época de peste e fome, alta mortalidade por infecções, desnutrição, doenças materno infantis. Época de recuo das pandemias, redução das doenças infectocontagiosas. Época de doenças degenerativas e antropogênicas, alta mortalidade por doença cardíaca isquêmica e cânceres. Época de demências e doenças degenerativas, em pessoas com idades mais avançadas. Época de obesidade e inatividade, postulada por tendências adversas a atividade física e dieta (GAZIANO, 2010).

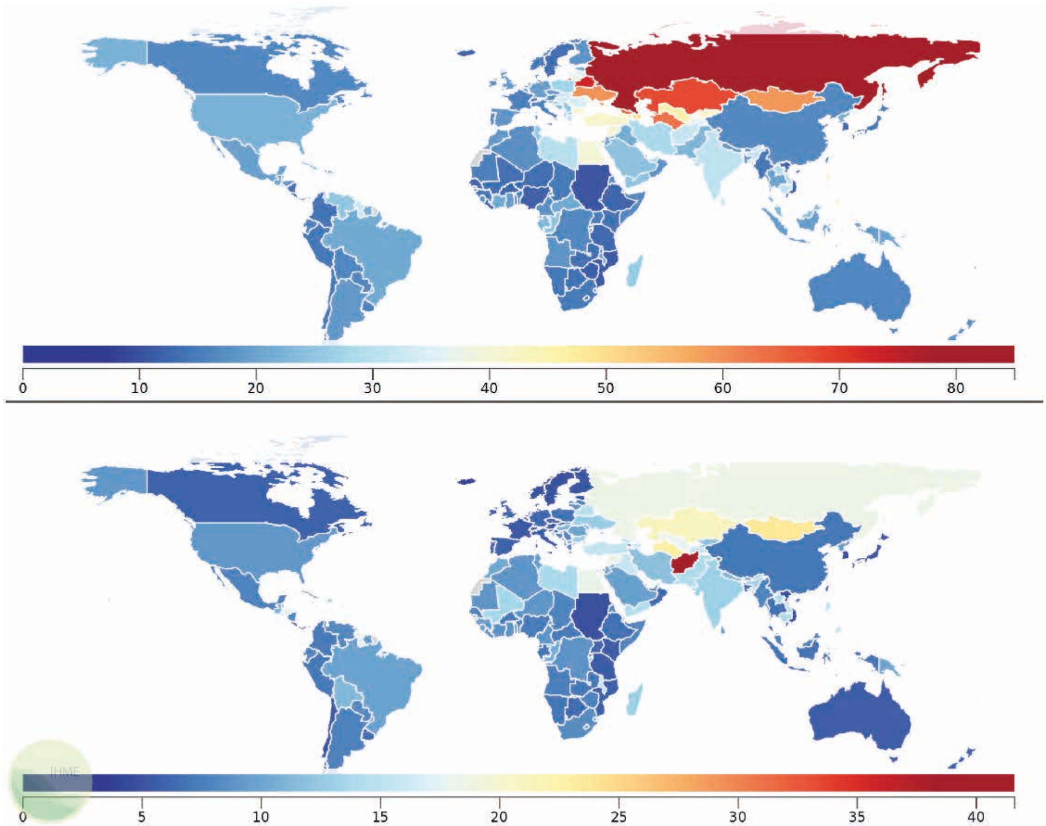


Figura 1. Taxa de mortalidade em homens (parte superior) e mulheres (parte inferior) com idades entre 15 e 49 anos, ocasionada por doença isquêmica do coração. Dados derivados do Índice Global de Doenças em 2012, expressos por 100 000 habitantes (VEDANTHAN et al, 2014).

A insuficiência cardíaca é definida como uma síndrome clínica complexa, resultante de alterações estruturais ou funcionais que modificam a capacidade de enchimento ou de ejeção ventricular, na qual há evidência de desequilíbrios no estado redox. A prevalência de insuficiência cardíaca tende a aumentar no mundo ocidental em cerca de 46% até 2030 e a sua taxa de mortalidade mantém-se em redor dos 50% aos cinco anos após o diagnóstico, (COSTA et al, 2015).

Abordagens de tratamento das doenças cardiovasculares pode se dividir em 2 categorias: intervenções para eventos agudos e intervenções para a prevenção primária e secundária. De acordo com o Projeto de Prioridades no Controle de Doenças, estreptoquinase foi o melhor custo-benefício para terapia de reperfusão a custar US $ 634 a US $ 734 por ano de vida ajustado por incapacidade. Esta estratégia, no entanto, tornou-se mais caro quando o tempo de tratamento aumentou. Alteplase, glicoproteína ativadora de plasminogênio tecidual, e cirurgia de revascularização do miocárdio apresentaram

maior custo por dia. O uso de aspirina, β-bloqueadores, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) foram mais rentáveis em algumas circunstâncias (GAZIANO, PAGIDIPATI, 2013).

A gestão hospitalar baseada em evidências pode utilizar outros recursos, como a anticoagulação, medicamentos antiplaquetários, e as estatinas, que pode ser melhorado com a implementação de abordagens a nível de sistemas, tais como listas de verificação (*check list*), gerenciamento de casos e materiais. Essas medidas fazem parte da prevenção primária e secundária das doenças cardiovasculares (BERWANGER et al, 2012).

ISQUEMIA E REPERFUSÃO CARDÍACA

A isquemia é caracterizada por uma diminuição absoluta ou relativa no fornecimento de sangue do tecido ou órgão, devido ao bloqueio de vasos sanguíneos. Os vasos sanguíneos podem ser obstruídos por trombo, placa aterosclerótica, inflamação ou vasoconstrição. Durante a isquemia miocárdica a ausência de oxigênio e substratos metabólicos para os cardiomiócitos pode causar alterações funcionais, estruturais e metabólicas. Como consequência, a célula muda o metabolismo para anaeróbico, resultando em acúmulo de lactato e geração de acidose (GOMES et al, 2011; BACAKSIZ et al, 2013; HAUSENLOY, YELLON, 2013).

Condições hipóxicas levam a diminuição de concentrações intracelulares de trifosfato de adenosina (ATP) e fosfato de creatina (CP), que resulta em diminuição da atividade iônica dependente de ATP, incluindo bomba Na^+/K^+ ATP-ase e exacerbação da função contrátil. A inativação de Na^+/K^+ ATP-ase contribui para sobrecarga intracelular de Na^+. O baixo pH intracelular induz a ativação do trocador sódio/próton Na^+/H^+ presente na membrana celular que leva o H^+ para meio extracelular e carreia o Na^+ para o interior da célula, resultando na acumulação deste último no citosol. Isto leva a ativação do trocador sódio/cálcio (NCX) que troca estes íons na proporção de $2Na^+$: Ca^{2+}, a fim de expulsar o excesso de Na^+ gerando o acúmulo de Ca^{2+} intracelular (Figura 2). Todos esses fatores e a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) podem levar a célula a morte (JEREMIC et al, 2015).

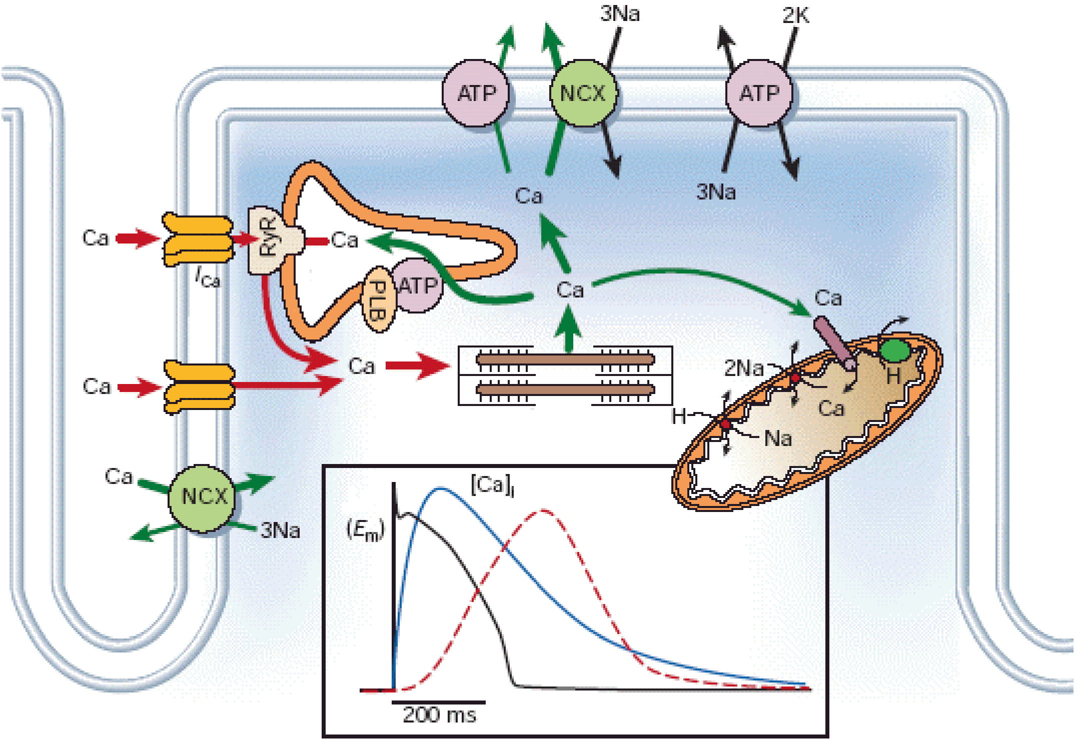


Figura 2. Esquema geral da sinalização intracelular de cálcio no miócito cardíaco. Observa-se abaixo a escala temporal da variação do potencial de membrana na célula cardíaca (Em) durante um potencial de ação, a variação da concentração intracelular de cálcio $[Ca]_i$ e a contração cardíaca. RyR: receptor de rianodina; PLB: Fosfolamban; NCX: trocador sódio/cálcio; ATP: trifosfato de adenosina; Ca: cálcio, K: potássio; Na: sódio e H: hidrogênio (BERS, 2002).

A contratura cardíaca é consequência do processo isquêmico e está relacionada à redução sustentada e enrijecimento do miocárdio decorrente de várias causas. A patogênese de contratura induzida por reperfusão pode ser por sobrecarga de Ca^{2+}. A contratura por sobrecarga de Ca^{2+} surge em virtude das altas concentrações no citosólicas de Ca^{2+}, resultante do transporte iônico do NXC em modo inverso durante a isquemia, assim como, da saída destes íons do retículo sarcoplasmático (RS) durante a reperfusão. Essa sobrecarga provoca uma ativação miofibrilar descontrolada, que também é alimentada pelo reabastecimento de ATP. Estes mecanismos celulares contribuem para hipercontratura dos cardiomiócitos que é uma das causas de lesão celular letal que ocorre durante a reperfusão (Figura 3) (WALTERS, 2014).

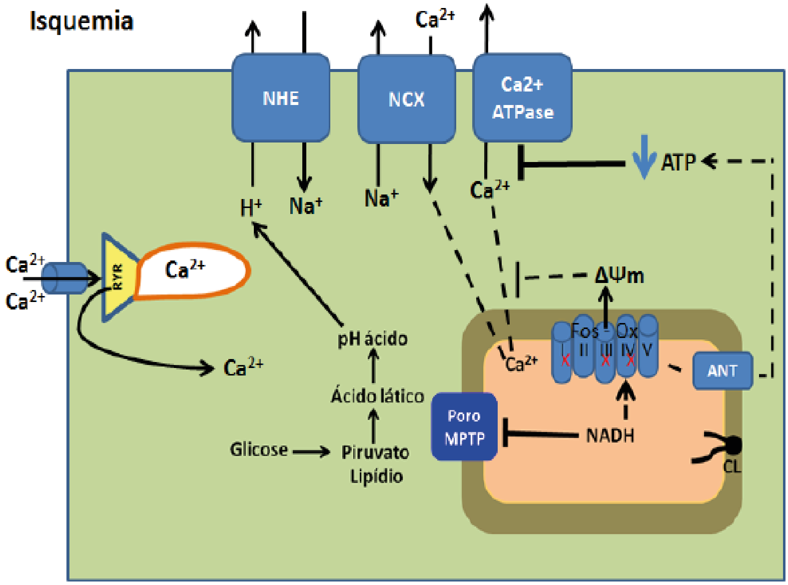


Figura 3. Eventos ocorridos durante à isquemia cardíaca, adaptado de Walters, Porter, Brookes (2012). NHE: trocador sódio-hidrogênio; NCX: trocador sódio/cálcio; Ca^{2+}-ATPase: bomba para cálcio; Poro MPTP: poro de transição de permeabilidade mitocondrial; Fos – Ox: cadeia transportadora de elétrons; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo hidreto; CL: cardiolipina; Ca^{2+}: íons cálcio; Na^{+}: sódio; H^{+}: hidrogênio; ATP: adenosina trifosfato; ANP: adenina nucleotídeo translocase; RyR: receptor de rianodina.

Com a reperfusão e consequente reintrodução de O_2 a atividade do NCX é restaurada, levando à saída de Ca^{2+} para o meio extracelular em troca de Na^{+} para o meio intracelular (Figura 4). Todavia, com a volta da atividade das mitocôndrias e a consequente reativação da cadeia transportadora de elétrons ocorre uma grande produção de EROs e de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (WALTERS, PORTER, BROOKES, 2012).

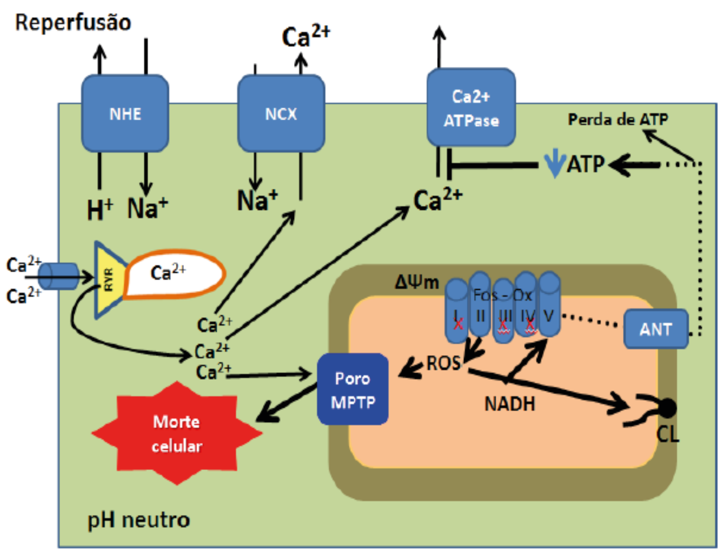


Figura 4. Eventos ocorridos durante à reperfusão cardíaca, adaptado de Walters, Porter, Brookes (2012). NHE: trocador sódio-hidrogênio; NCX: trocador sódio/cálcio; Ca^{2+}-ATPase: bomba para cálcio; Poro MPTP: poro de transição de permeabilidade mitocondrial; Fos – Ox: cadeia transportadora de elétrons; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo hidreto; CL: cardiolipina; Ca^{2+}: íons cálcio; Na^+: sódio; H^+: hidrogênio; ATP: adenosina trifosfato; ANP: adenina nucleotídeo translocase; RyR: receptor de rianodina.

A lesão de isquemia/reperfusão (I/R) do miocárdio é um processo patológico complicado, com mecanismos subjacentes que abrangem uma gama de mudanças biológicas fundamentais, incluindo iônica, inflamatória, o estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e apoptose. Estes mecanismos ainda precisam ser completamente compreendidos. Estudo recente tem demonstrado que o retículo endoplasmático (RE) está intimamente associado com a lesão de I/R. O RE é uma extensa rede membranosa intracelular envolvida na síntese de proteínas, homeostase de cálcio e altamente sensível a uma variedade de condições de estresse, tais como as EROs, capazes de interromper a função desta organela (XU et al, 2015).

A disfunção mitocondrial é um fator importante, líder na perda de função e viabilidade de cardiomiócitos. Os mecanismos moleculares da disfunção mitocondrial incluem uma abertura de longa duração dos poros de transição da permeabilidade mitocondrial e produção de estresse oxidativo resultante das EROs. Estudos mais recentes indicaram que a abertura de longa duração dos poros de transição da permeabilidade mitocondrial desempenha um papel crucial na lesão de reperfusão e pode ser regulada por vários fatores, incluindo pH elevado, sobrecarga de Ca^{2+}, e produção de EROs no início da reperfusão (SONG et al, 2015).

No coração, as EROs podem alterar a função de vários canais iônicos (canais para cálcio tipo L, para sódio e para potássio) e inibir a atividade da bomba membranar de cálcio do retículo sarcoplasmático (Ca^{2+}ATPase SERCA2). Podem ainda induzir modificações de proteínas importantes para a contratilidade cardíaca. A fosforilação da troponina T por cinases ativadas por EROs pode contribuir para a redução da contratilidade cardíaca (COSTA et al, 2015).

Um aumento na geração de EROs é um dos eventos-chave na lesão de I/R, este aumento excessivo provoca a lesão mitocondrial, incluindo a perda de seu potencial de membrana e uma série de eventos que resultam na apoptose. Por conseguinte, a inibição da produção de EROs e proteção da mitocôndria contra danos oxidativos são estratégias eficazes para reduzir a lesão I/R do miocárdio (WANG et al, 2015).

ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE

O organismo humano sofre ação constante das EROs e ERNs geradas em processos inflamatórios, por alguma disfunção biológica, ou provenientes dos alimentos. As principais EROs (Figura 5) distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila ($HO^{\bullet}$), ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peroxila ($ROO^{\bullet}$) e alcoxila ($RO^{\bullet}$); e os não-radicalares: oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HClO). Dentre as ERNs incluem-se o óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos ($ONOO^-$). Alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, enquanto outros são reativos apenas com os lipídios (BARREIROS et al, 2006).

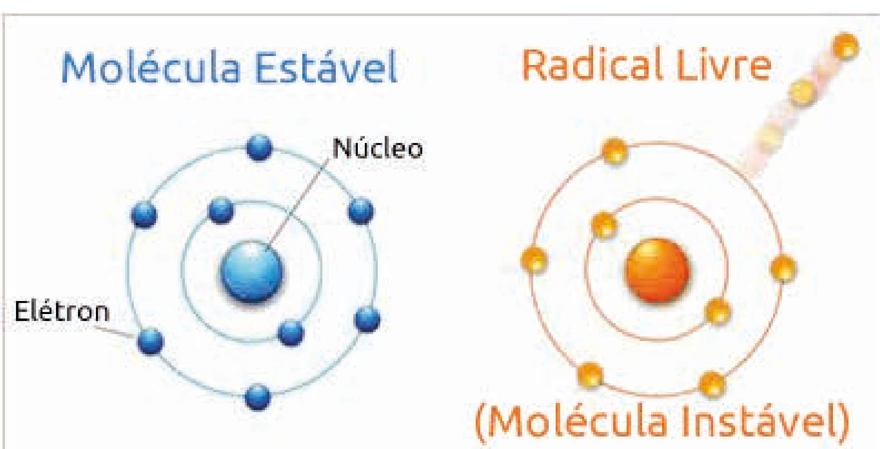


Figura 5. Ilustração do equilíbrio eletrostático presente em uma molécula estável, à esquerda, e em uma molécula instável, à direita.

O radical $OH^{\bullet}$ é o mais deletério ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. Estes radicais frequentemente atacam as moléculas por remoção de hidrogênio e por adição de insaturações. Nos experimentos de laboratório o $OH^{\bullet}$ pode facilmente ser sequestrado *in vitro* por inúmeras moléculas, devido a sua alta reatividade. No entanto, para que os resultados *in vitro* se reproduzam *in vivo*, é necessário ministrar alta concentração do antioxidante para que este alcance o órgão-alvo, local onde o radical $OH^{\bullet}$ está presente em concentração suficiente para removê-lo. Existem maneiras de controlar os danos causados pela presença do radical $OH^{\bullet}$, dentre elas, inibir sua formação e eliminar parte destas espécies logo após sua produção (SANTOS et al, 2014).

As EROs atuam estimulando várias enzimas da família das cinases de proteínas ativadas por mitogênios (MAPK), tais como as cinases reguladas por sinais extracelulares (ERK 1/2) e a cinase reguladora da sinalização apoptótica, de tipo 1 (ASK-1), contribuindo para o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca. A ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear-κB (NF-κB) e a proteína ativadora 1 (AP-1) está também envolvida na hipertrofia cardíaca induzida pelas EROs. As EROs podem ainda estimular a proliferação de fibroblastos cardíacos e ativar metaloproteínases da matriz extracelular (MMP), com consequente remodelação da matriz extracelular. Estas alterações são importantes determinantes da remodelação miocárdica adversa (COSTA et al, 2015).

As EROs podem contribuir para a gênese e progressão da doença coronariana. As EROs produzidas na parede vascular estão envolvidas na formação da lipoproteína de baixa densidade, LDL oxidado (oxLDL), que desempenha um papel fundamental na patogênese da aterosclerose. A ativação de metaloproteínases da matriz extracelular pelas EROs pode também contribuir para a instabilidade e ruptura da placa de ateroma nas artérias coronárias e consequente trombose. As EROs participam ainda na lesão de reperfusão e necrose tecidual, causadas pelo infarto do miocárdio (COSTA et al, 2015).

As EROs podem modificar aminoácidos por reações em cadeias, por meio de agregados de proteínas suscetíveis a degradações proteolíticas. Durante esse processo, alguns aminoácidos são convertidos em derivados de carbonil. Evidência científica atual tem demonstrado que o uso terapêutico de produtos naturais contribui com a ação do sistema de defesa antioxidante (KHAILL et al, 2015).

A Catalase é tradicionalmente considerada uma proteína peroxissomal com função enzimática antioxidante, pode estar presente na mitocôndria cardíaca (Figura 6) e foi encontrado um aumento significativo na sua expressão e atividade, em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica, demonstrando a importância da CAT como mecanismo endógeno do sistema de defesa antioxidante (RINDLER et al, 2013).

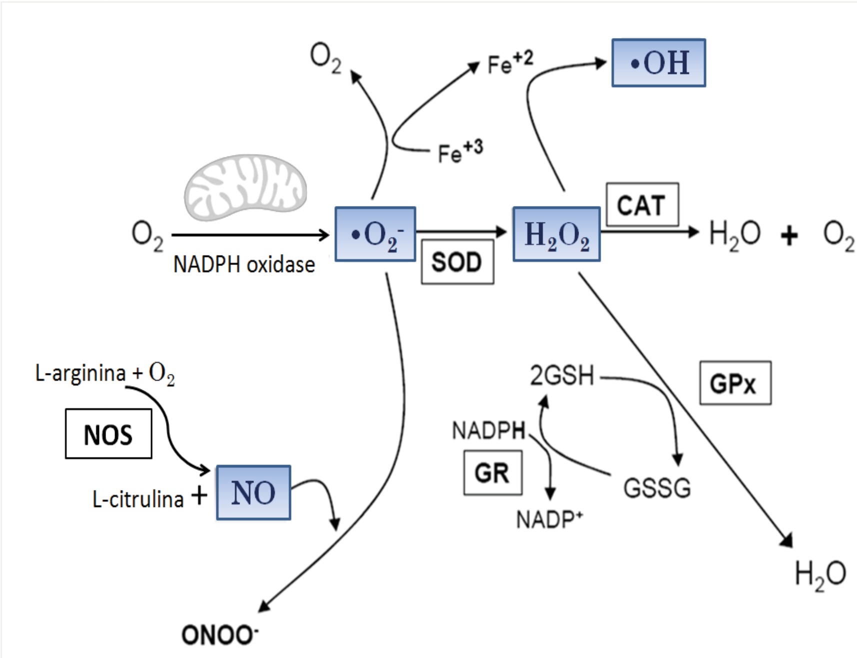


Figura 6. Esquema da formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Podemos observar a conversão do oxigênio (O_2) em ânion superóxido ($\bullet O_2^-$) pelas enzimas NADPH oxidase (processo que ocorre principalmente na mitocôndria). O $\bullet O_2^-$ é dismutado pela superóxido dismutase (SOD), formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que pode ser convertido em uma molécula de água (H_2O) + O_2 pela catalase (CAT) e/ou glutationa peroxidase (GPx). O H_2O_2 pode formar radical hidroxila (•OH) podendo reagir com o ferro (Fe^{+2}) na reação de Fenton. A glutationa peroxidase (GPx) reduz todos os hidroperóxidos utilizando glutationa reduzida (GSH), um doador de hidrogênio. Outra enzima, a glutationa redutase (GR), mantêm o equilíbrio entre GSH e glutationa oxidada (GSSG). O óxido nítrico (NO) é formado por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a partir do aminoácido L-arginina que produz NO e L-citrulina. O $\bullet O_2^-$ também pode reagir com o NO para formar peroxinitrito (ONOO) (GRIENDLING & FITZGERALD, 2003).

A Glutationa (GSH) no meio intracelular é considerada a molécula mais abundante dentre os antioxidantes endógenos. GSH (γ-L-glutamil-L-cisteinil-glicina) é um peptídeo constituindo de três aminoácidos. Em humanos, a alta concentração de GSH (1-10 mmol) permite a liberação direta ou indireta das EROs. A glutationa redutase (GR) é a enzima crítica para a redução de glutationa oxidada (GSSG) de volta para glutationa reduzida (GSH). A GR utiliza dinucleotídeo flavina adenina (FAD) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) para reduzir uma GSSG em duas GSH (ESPINOSA-DIEZETAL, 2015).

ÓLEOS ESSENCIAIS, TERPENOS E CARVACROL

Os óleos essenciais são líquidos voláteis, aromáticos e extraídos de materiais de plantas, tais como flores, raízes, cascas, folhas, sementes, frutas, madeira. Estes óleos essenciais têm sido utilizados na medicina, perfumaria, cosmética, adicionados a

alimentos e como especiaria. Estas substâncias são consideradas como metabólitos secundários importantes para a defesa da planta, pois muitas vezes possuem propriedade antimicrobiana, que foram avaliadas primeiramente por De la Croix em 1881, usando vapores de óleo essencial (HYLDGAARD et al, 2012; BARRETO et al, 2014).

Os terpenos são os hidrocarbonetos produzidos a partir de combinação de vários isoprenos (C_5H_8), sua unidade básica. Eles são sintetizados no citoplasma das células de plantas e este processo ocorre a partir do ácido mevalônico (MVA), via acetil-CoA e provenientes do metileritritol fosfato (MEP), oriundo de unidades de piruvato e gliceraldeído-3 fosfato. Terpenos apresentam uma cadeia de hidrocarbonetos que podem ser rearranjados em estruturas cíclicas por ciclases, formando assim estruturas monocíclicas ou bicíclicas. Os principais terpenos são monoterpenos ($C_{10}H_{16}$) e sesquiterpeno ($C_{15}H_{24}$), mas cadeias mais longas tais como diterpenos ($C_{20}H_{32}$), triterpenos ($C_{30}H_{40}$), também existem (BASER, 2008).

Os monoterpenos são numerosos, diversificados e naturalmente orgânicos, cujas moléculas mais representativas constituem 90% dos óleos essenciais. Apresentam grande variedade de estruturas com propriedades farmacológicas relevantes, tais como antimicrobianos, anti-inflamatórios, antioxidante (Figura 7), antipruriginoso, hipotensor e atividades analgésicas. Assim, plantas medicinais e compostos relacionados têm tradicionalmente desempenhado um papel importante na descoberta de drogas e constituem a base dos primeiros medicamentos (YU, LIU, ZHU, 2013).

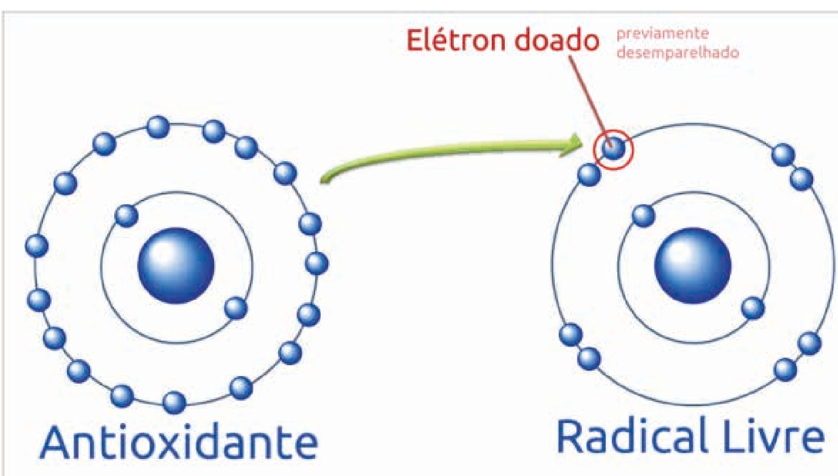


Figura 7. Ilustração de uma molécula antioxidante, que pode agir como doador de elétron, estabilizando assim, o radical livre.

Os compostos fenólicos exibem grande quantidade de propriedades fisiológicas

como antialérgica, antiarteriogênica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotetora e vasodilatadora, mas o principal efeito dos compostos fenólicos tem sido atribuído à ação antioxidante em alimentos (DEL RÉ & JORGE 2012).

Em geral os compostos fenólicos são multifuncionais como antioxidantes, pois atuam de várias formas: combatendo os radicais livres, quelando metais de transição, interrompendo a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica, modificando o potencial redox do meio, reparando a lesão das moléculas atacadas por radicais livres. Também bloqueiam a ação de enzimas específicas que causam inflamação na biossíntese dos eicosanoides; modificam as rotas metabólicas das prostaglandinas; protegem a aglomeração plaquetária e inibem a ativação de carcinógenos (DEL RÉ & JORGE 2012).

Carvacrol (CAR), 2-metil-5-isopropilfenol, é um monoterpeno fenólico presente no óleo essencial da família Lamiaceae, que inclui os gêneros Origanum e Thymus, tem como isômero, o timol (Figura 8). O CAR é considerado como um aditivo alimentar seguro e tem sido amplamente utilizado como aromas químicos, em doces e bebidas por muitos anos (YU, LIU, ZHU, 2013).

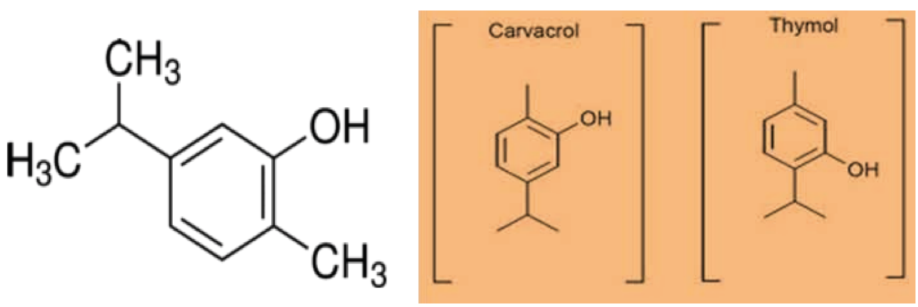


Figura 8. Estrutura molecular do carvacrol, à esquerda e carvacrol com seu isômero timol, à direita.

Estudo mostrou que CAR diminui a motilidade bacteriana e virulência em concentrações sub-letais. Algumas bactérias foram estudadas como *Chromobacterium violaceum,* provoca sepse e abcessos hepáticos*; Salmonella entérica,* infecção alimentar; *Staphylococcus aureus,* pneumonia; *Pseudomonas aeruginosa,* infecção hospitalar. Estes resultados indicam que a atividade do carvacrol na inibição da formação de biofilme pode estar relacionada com a ruptura do *quorum sensing*, liberação de sinais químicos secretados a partir de células, capazes de induzir diversas alterações como a regulação da expressão de genes dependentes da densidade celular (BURT el al, 2014).

Além disso, o CAR parece ter significativa ação antitumoral. Em um estudo foi demonstrado sua atividade citotóxica significativa contra a leucemia P388 em ratos. O CAR também exerce efeitos citotóxicos em células K562, HepG2, e células Caco-2 do cólon e

reduziu significativamente danos no DNA induzido nessas células pelo H_2O_2, forte oxidante. Este monoterpeno exibe ainda citotoxicidade contra células de melanoma B16-F10 e esta citotoxicidade é reduzida pela adição de vitamina C (ácido ascórbico) e vitamina E (α-tocoferol) (SOBRAL et al, 2014).

Aristatile e colaboradores (2015) mostraram o efeito protetor do CAR sobre o estresse oxidativo e danos no DNA celular induzido pela radiação UVB em linfócitos periféricos humanos. A exposição aos raios ultravioleta B (UVB; 280-320 nm) induziu a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) no sistema biológico. Exposição UVB aumentou significativamente substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), lipídios hidroperóxidos (LHPs), percentual de danos ao DNA; diminuição da viabilidade celular. O tratamento com o CAR 30 min antes da exposição UVB resultou num declínio significativo de TBARS, %LHP, percentual de danos ao DNA e aumentou a viabilidade celular, de forma dependente de concentração, indicando que esta molécula se apresenta como antioxidante dietético.

B-ciclodextrina

A CD apresenta-se numa estrutura em forma de cone (Figura 9) onde os grupos hidroxila primários são orientados para a extremidade estreita deste cone, e os secundários estão posicionados na extremidade mais larga. Assim, esta estrutura tem uma cavidade hidrofóbica e uma superfície exterior hidrofílica, capaz de formar complexos de inclusão (CIs) com várias moléculas, incorporando-os para dentro da cavidade (NARDELLO-RATAJ & LECLERCQ, 2014).

A formação de CIs pode modificar as propriedades biológicas da molécula hóspede, ampliando o seu campo de aplicações por alterações físicoquímicas das moléculas. A capacidade de uma CD para formar um CI com uma molécula hóspede está relacionada a fatores termodinâmicos. As forças motrizes para a formação do complexo são atribuídas à remoção de moléculas de água a partir da cavidade hidrofóbica e a formação de Van der Waals (ACUNA-ROUGIER, OLEA-AZAR, 2013).

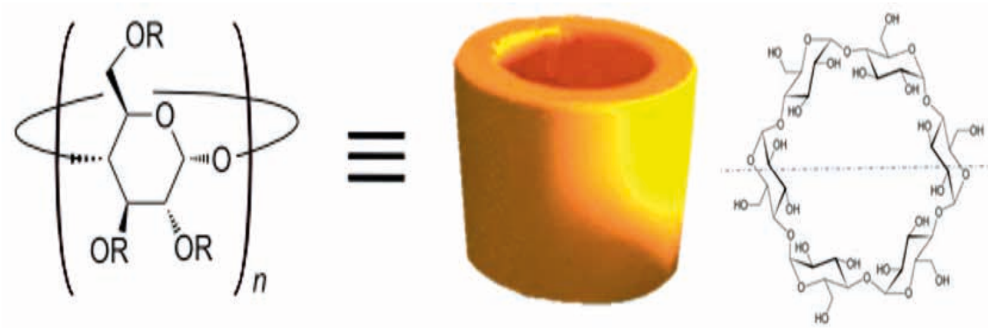


Figura 9. Fórmula molecular da ciclodextrina, à esquerda, e ilustração do arranjo da estrutura, à direita (NARDELLO-RATAJ & LECLERCQ, 2014).

Outro método para formar complexos de inclusão baseia-se na ligação de moléculas β-CD a uma substância insolúvel pré-existente na matriz covalente, tal como polímeros sintéticos. A β-CD favorece a imobilização em suportes insolúveis e pode ser considerada como um meio adequado para obter materiais insolúveis com propriedades específicas, tais como aditivos de administração funcional ou para atuar como sensores ou filtros. O CI apresenta diversas vantagens, torna a molécula complexada mais estável e mais solúvel; apresenta liberação controlada; reduz a volatilidade e pode aumentar a biodisponibilidade (FOLCH-CANO, 2014).

COMPLEXOS DE INCLUSÃO À β-Ciclodextrina

O geraniol, monoterpeno acíclico natural derivado a partir de óleos de ervas com efeito ação antioxidante conhecida, foi complexado à β-CD utilizando métodos de mistura física, coevaporação e malaxagem. Para comprovar a formação de complexo de inclusão, as amostras obtidas foram avaliadas através de termogravimetria e método de Karl Fisher. A análise térmica indicou claramente a formação de complexos por métodos de coevaporação e malaxagem, mas os melhores resultados foram obtidos, especialmente no caso de amostras de malaxagem GO/β-CD (MENEZES et al, 2012).

O linalol é um monoterpeno fenólico presente em óleos essenciais de várias plantas aromáticas, apresenta diversas propriedades biológicas, antitumoral, antioxidante, e antinociceptivas, comprovada por estudos com diferentes modelos animais. O complexo de inclusão linalol com β-CD foi preparado por mistura física, malaxagem, e coevaporação. Os complexos de inclusão obtidos foram avaliados principalmente por calorimetria diferencial de varredura, análise termogravimétrica, difração de raios X e titulação de Karl Fischer. A caracterização térmica indicou a ocorrência de maior complexação em amostras da malaxagem, apresentou uma perda gradual de massa (4,6%) no intervalo de 140 a 280°C,

provavelmente relacionadas com a perda de linalol (MENEZES et al, 2014).

A formação de complexos de inclusão de p-cimeno com β-CD usando os métodos de mistura física, malaxagem e coevaporação foi avaliada por medidas indiretas de complexação. Os resultados de calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria mostraram que os produtos preparados por métodos de malaxagem e coevaporação foram capazes de incorporar maiores quantidades de p-cimeno, como evidenciado pela perda de peso de 7,15 e 3,97%, respectivamente, o que ocorreu entre 120 e 270°C. A microscopia eletrônica de varredura mostrou diminuição do tamanho do agregado, em especial no produto coevaporado, indicando a formação do complexo de inclusão p-cimeno/β-CD principalmente na amostra obtida por coevaporação (SERAFINI et al, 2011).

As propriedades terapêuticas de monoterpenos como o CAR tem sido muito estudadas, especialmente tem-se utilizado complexos de inclusão de substâncias insolúveis como o CAR à β-CD. A sua aplicação no controle de condições dolorosas e na inflamação foi avaliada na nocicepção induzida por células de tumor (Sarcoma 180) em roedores. Os complexos de inclusão foram preparados em dois procedimentos, mistura física; coevaporação e caracterizados por análise térmica e microscopia eletrônica de varredura. CAR/β-CD foi administrado (50 mg/Kg) em ratos com tumor na pata traseira, sendo, esta substância, capaz de reduzir a hiperalgesia durante 24 h. No entanto, o CAR livre (100 mg/Kg), manteve o efeito nociceptivo durante 9 h. O CAR livre (50 mg/Kg) não causou alterações significativas nas respostas nociceptivas. Estes resultados indicam que a complexação do CAR à β-CD pode ser útil para o desenvolvimento de novos fármacos, neste caso, na investigação de novas opções para o manejo da dor (GUIMARÃES et al, 2010).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o efeito cardioprotetor do complexo de inclusão carvacrol/β-ciclodextrina na lesão de reperfusão cardíaca após isquemia em ratos.

Objetivos Específicos

- Caracterizar fisicoquimicamente a formação do complexo de inclusão carvacrol/β-ciclodextrina;
- Avaliar os parâmetros da função contráctil cardíaca e a ação antiarrítmica após o pré-tratamento com carvacrol/β-ciclodextrina e carvacrol;
- Mensurar a extensão da lesão isquêmica cardíaca após o pré-tratamento com carvacrol/β-ciclodextrina e carvacrol;
- Medir os danos oxidativos em componente celulares (lipídeos e proteínas) decorrentes da lesão de isquemia e reperfusão cardíaca, após o pré-tratamento com carvacrol/β-ciclodextrina e carvacrol;
- Analisar a atividade de enzimas antioxidantes após a lesão de isquemia e reperfusão cardíaca em animais submetidos ao pré-tratamento com carvacrol/β-ciclodextrina e carvacrol.

COMPLEXAÇÃO DO CARVACROL À Β-CICLODEXTRINA

O CAR com 98% de pureza (lote # S40656V) e a β-CD com 97% de pureza (lote # MKBR3596V) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil.

As amostras foram obtidas por três métodos diferentes. A mistura física (PM) foi preparada mediante a adição de CAR (150 mg, com base no seu peso molecular) a um almofariz contendo β-CD, sob agitação manual, na razão molar 1:1. A amostra foi armazenada em recipientes de vidro, hermeticamente fechados.

A malaxagem (PC) foi obtida na razão molar 1:1 (hospedeiro : hóspede), conforme já citado no método anterior. A essa mistura foram adicionados 2 mL de água destilada sob agitação constante até obtenção de uma pasta. Em seguida, esta foi mantida em dessecador de vidro em temperatura ambiente até a secagem.

Para a coevaporação (SC) foram adicionados 20 mL de água em um recipiente contendo 1135 mg de β-CD (3:4, m/v, mg/mL), no qual foi adicionado CAR (150 mg), na razão molar 1:1. A mistura foi agitada durante 36 horas em agitador magnético (Quimis Q 261A21, Brasil) operando a 400 rpm (rotação por minuto). Em seguida, a mistura foi transferida para um almofariz e submetida à secagem (MENEZES et al, 2012).

Determinação das razões de inclusão dos terpenos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

Alíquotas de 200 mg de cada amostra foram colocadas em tubos de vidro contendo 8,0 mL de água e 4,0 mL de hexano, e posteriormente mantidas em banho-maria a 85°C por 20 min. A fase orgânica foi retirada e o procedimento repetido três vezes. Em seguida, as fases orgânicas das lavagens foram reunidas e 1,0 mL de hexano e 2,0 mg do padrão interno (mentol) foram adicionados. O extrato foi concentrado para aproximadamente 1,0 mL usando um evaporador rotativo e armazenada em frascos a cerca de 4°C até a análise em CG/EM (Figura 10). O óleo total corresponde à soma do hóspede da cavidade da β-CD mais o adsorvido na superfície.

Extração do óleo adsorvido na superfície da β-CD

Para extração dos compostos voláteis adsorvidos na superfície da β-CD, 3,0 g do pó foram lavados com 20 mL de hexano sob agitação durante 20 min. A suspensão foi então filtrada e o resíduo lavado novamente com 10 mL de hexano. Em seguida, 1,0 mL de hexano e o 2,0 mg do padrão interno foram adicionados ao extrato, que foi concentrado e armazenado como descrito acima. A diferença entre o óleo total e o óleo adsorvido na superfície foi o montante do óleo complexado na cavidade da CD e foi utilizado para

determinar a razão de inclusão para cada composto (Figura 10).



Figura 10. Equipamento de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CG/EM).

Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros de infravermelho do CAR, β-CD, PM, PC e SC foram obtidos na faixa espectral de 4000–500 cm^{-1} em pastilhas de brometo de potássio (KBr) utilizando um Espectrômetro por Transformada de Fourier modelo IRTracer-100 da Shimadzu à temperatura ambiente (Figura 11).

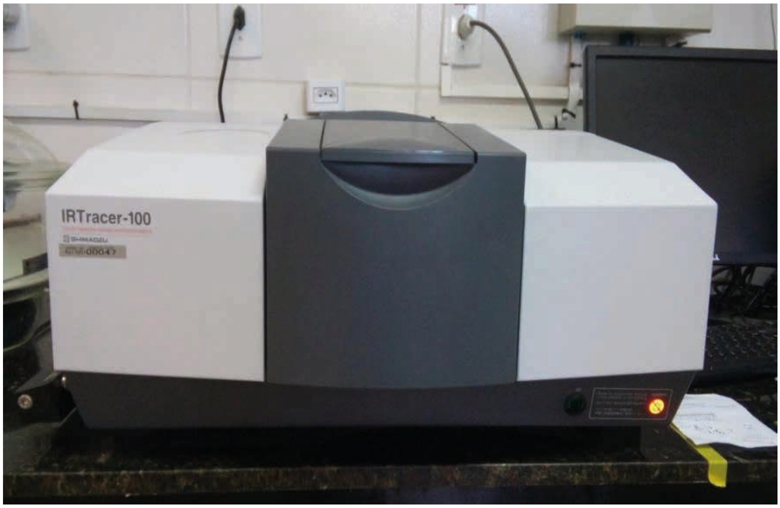


Figura 11. Equipamento de Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (FTIR).

Difrações de Raios X (DRX)

As difrações de raios X dos produtos foram obtidas em equipamento Siemens modelo D5000, com tubos de CuKα, sob intervalo de 3 a 65º (2θ) e 1 s a cada passo (Figura 12).



Figura 12. Equipamento de Difrações de Raios X (DRX)

Termogravimetria Derivada TG/DTG

As curvas TG/DTG foram obtidas em uma termobalança modelo TGA 50 (Shimadzu)

numa faixa de temperatura de 28 – 500ºC, usando porta-amostra de platina com ~3 mg de amostra sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 $mL.min^{-1}$) e razão de aquecimento de 10ºC.min^{-1} (Figura 13). A termobalança foi verificada usando oxalato de cálcio monoidratado ($CaC_2O_4.H_2O$).



Figura 13. Equipamento de Termogravimetria Derivada (TG/DTG)

Determinação de água por análise de Karl Fisher

Os percentuais de água das amostras obtidas pelos métodos da malaxagem e coevaporação, bem como a mistura física foram determinados pelo método de Karl Fisher, utilizando um equipamento modelo 870 KF Titrino Plus (Metrohm, USA) e metanol (Fluka, USA) como solução titulante. As análises foram realizadas em triplicata (Figura 14).



Figura 14. Equipamento de titulação de Karl Fisher.

ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar pesando entre 250 a 300 g e idade entre 2 e 3 meses. Os animais foram provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da UFS, e mantidos no Biotério Local do Laboratório de Biologia Cardiovascular e Estresse Oxidativo (LaBCEO) em gaiolas de polipropileno com grade de aço inoxidável (em número de até 5 animais/caixa) com temperatura (22 ± 2°C), ciclo claro/escuro (12/12 h) controlado por temporizador, ração e água *ad libitum,* até o dia do experimento.

Os procedimentos experimentais realizados nos animais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UFS sob protocolo 03/2015. Todos os procedimentos experimentais envolvidos no presente estudo estiveram de acordo com a Lei 11.794 e a Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

GRUPOS EXPERIMENTAIS

- **Salina (veículo):** animais pré-tratados com solução salina 0,9% v.o., que tiveram seus corações isolados e submetidos à isquemia e reperfusão.
- **Carvacrol/β-ciclodextrina 25 mg/Kg (CAR/β-CD 25):** animais pré-tratados com CAR/β-CD 25 mg/Kg v.o., que tiveram seus corações isolados e submetidos à isquemia e reperfusão.
- **Carvacrol livre 25 mg/Kg (CAR 25):** animais pré-tratados com CAR 25 mg/Kg

v.o., que tiveram seus corações isolados e submetidos à isquemia e reperfusão.

Cada grupo experimental foi composto por 5 animais, o tratamento foi administrado em doses diárias, via oral (v.o.) por gavagem, durante 7 dias (Figura 15). A administração do tratamento foi realizada sempre no mesmo horário do dia, com o objetivo de evitar o viés do período de efeito da substância entre uma administração e outra. O CAR/β-CD, salina (veículo) e CAR livre (CAR) foram administrados utilizando a solução salina 0,9% como veículo. O peso corporal dos animais foi monitorado durante todo o tratamento.

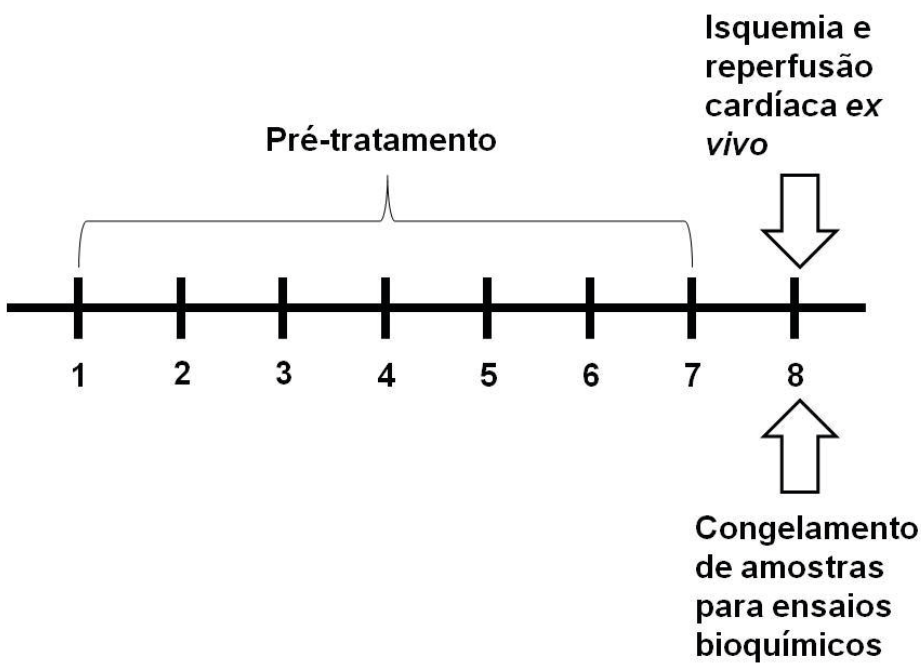


Figura 15. Esquema ilustrativo do protocolo experimental.

No 8º dia administrou-se heparina (1.000 U.I./kg) nos animais, via intraperitoneal (i.p.), substância anticoagulante. Após aguardar 15 minutos, os animais foram mortos, tiveram o coração removido e submetido à isquemia global e reperfusão *ex vivo*.

O cálculo da concentração foi realizado levando em consideração o peso molecular do CAR (150 g/mol) e β-CD (1.135 g/mol), sabendo que o complexo de inclusão foi preparado na razão molar 1:1. No pré-tratamento foram utilizados complexo de inclusão CAR/β-CD obtidos por coevaporação (SC), método que apresentou complexação parcial na proporção 1 β-CD:0,2 CAR.

A concentração estudada e a duração do tratamento foram selecionadas baseados

no trabalho de YU, LIU, ZHU (2013)[13] que estudou o efeito cardioprotetor do pré-tratamento com carvacrol (25, 50 e 100 mg/Kg), durante 7 dias consecutivos, antes de realizar a cirurgia para oclusão da artéria coronária esquerda, que caracteriza o modelo de infarto agudo do miocárdio em rato.

Os animais dos grupos veículo foram tratados inicialmente com a β-CD, mas como não havia diferença quando comparado ao pré-tratamento com solução salina 0,9%, decidimos então, utilizar a salina para tratar os animais deste grupo experimental. Esse achado pode ser justificado porque a β-CD é um maltooligossacarídeo cíclico e não apresenta efeito antioxidante (BELUCI & MORAES, 2013).

PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Solução de Perfusão

Foi utilizada a solução de Krebs-Henseleit para perfusão dos corações isolados composta por (em mmol/L): NaCl 118; KCl 4,7; KH_2PO_4 1,2; $MgSO_4.7H_2O$ 1,2; $C_6H_{12}O_6$ 11,1; $NaHCO_3$ 25,0 e $CaCl_2$ 2,5; o pH foi ajustado para 7,4. Em seguida, a solução foi filtrada utilizando uma membrana de nitrocelulose (*Merck Millipore, Alemanha*) acoplada a um suporte de aço inoxidável ligado a uma bomba de vácuo, com objetivo de remover partículas capazes de provocar microembolias no coração.

As soluções de perfusão foram preparadas um dia antes do experimento sendo que a glicose, o bicarbonato de sódio e o cloreto de cálcio foram adicionados no dia de utilizá-la.

Perfusão dos Corações Isolados Modelo de Isquemia e Reperfusão *ex vivo* e Estudo de parâmetros cardíacos

O sistema de Langendorff com pressão de perfusão constante foi utilizado nos experimentos de avaliação da função contrátil cardíaca (Figura 16) e neste mesmo sistema foi realizado o modelo de isquemia global e reperfusão cardíaca, simultaneamente ao estudo dos parâmetros fisiológicos cardíacos do órgão isolado[44]. Os registros das medidas de pressão sistólica e diastólica foram obtidos por transdutor de pressão (HP 1290A), amplificados (HP 8805B) e digitalizados (DATAQ DI-205, DI-400, Windaq Pro) e gravados em computador utilizando-se, para aquisição dos dados, o software WindaqEx (BURT et al, 2014).

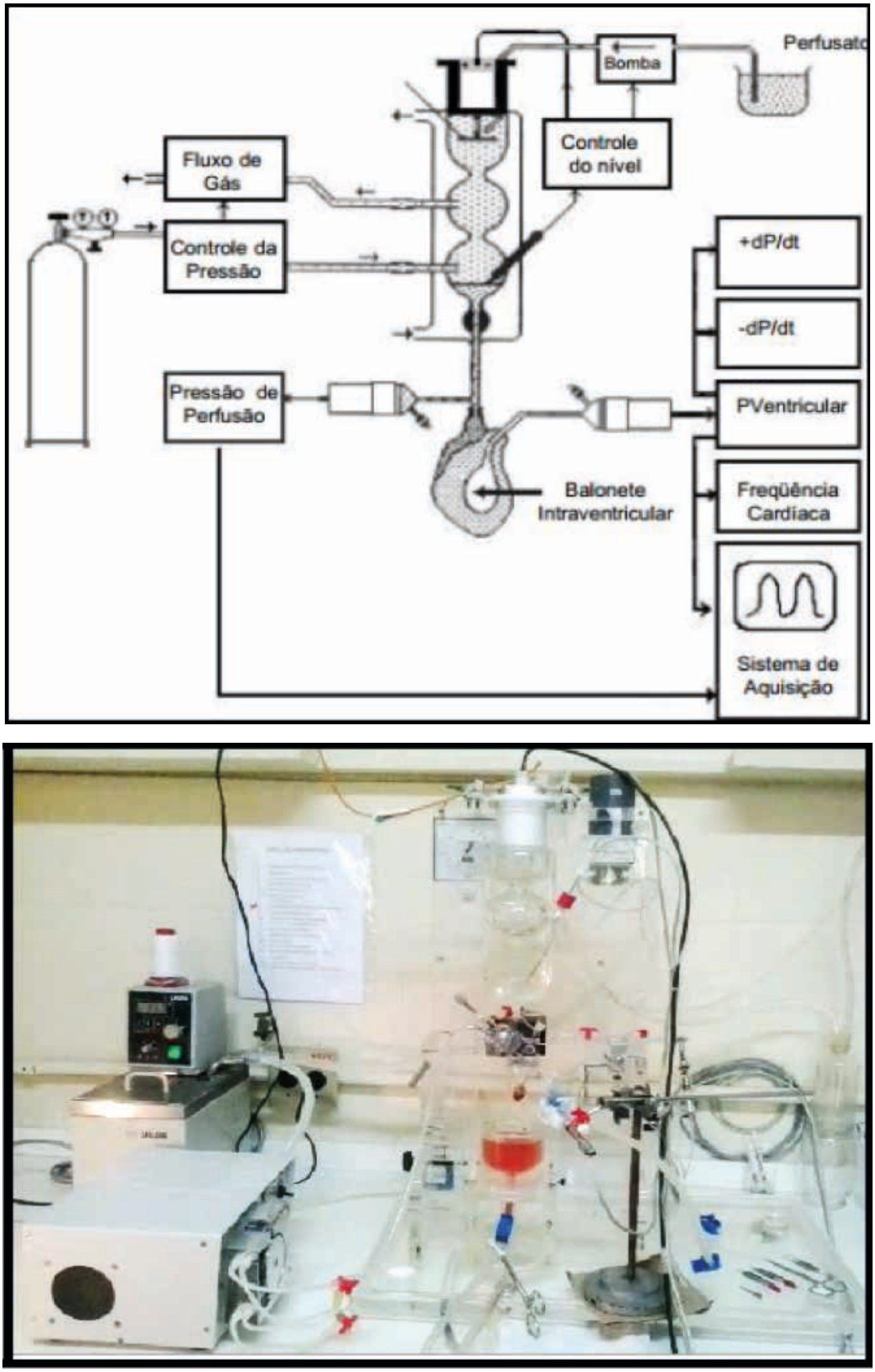


Figura 16**.** Esquema do Sistema de Perfusão Langendorff (BONETTO, 2015).

Resumidamente, o coração foi removido e a aorta ascendente do coração foi fixada

a uma cânula metálica com uma linha de algodão e então esta montagem foi conectada ao sistema de perfusão de órgão isolado do tipo Langendorff.

Para a perfusão do coração foi utilizada solução de Krebs-Henseleit, oxigenada com mistura carbogênica (95% de CO_2 e 5% de O_2 - White Martins®, Brasil) e aquecida a 37°C por uma jaqueta de água acoplada a um reservatório com um termostato (HAAKE C F3).

O balonete de látex (Figura 17) ligado ao transdutor de pressão foi previamente calibrado utilizando-se uma coluna de mercúrio. O átrio esquerdo foi removido para permitir a introdução do balonete no ventrículo esquerdo, e assim, poder captar os sinais de pressão que foram gravados. A pressão diastólica final no ventrículo esquerdo foi estabelecida em torno de 15 mmHg.

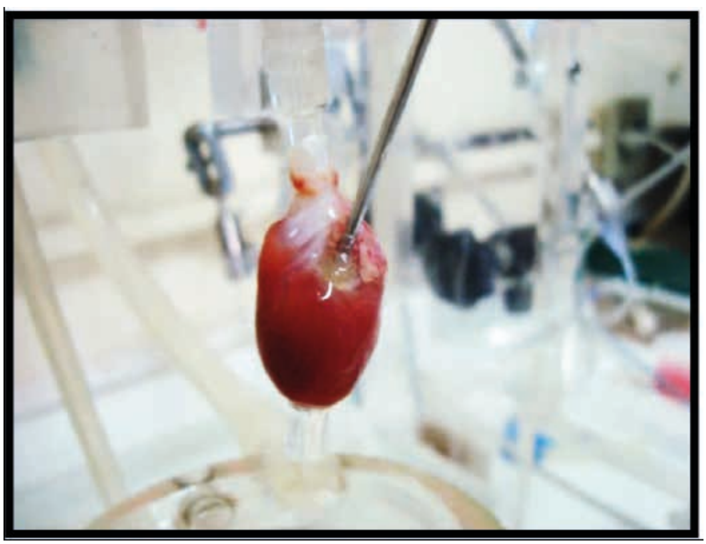


Figura 17. Coração isolado canulado através da aorta ascendente e com balonete inserido no ventrículo esquerdo no Sistema Langendorff (BONETTO, 2015).

Após o período de estabilização, primeiros 20 min, as medidas foram coletadas por mais 30 min de isquemia global, fluxo interrompido, e 60 min de reperfusão, retorno do fluxo, como ilustrado na Figura18 (BELL et al, 2011).

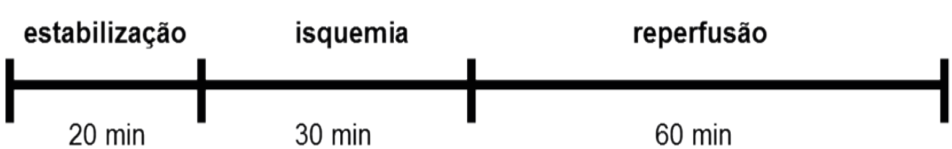


Figura 18. Esquema protocolo do decurso temporal do experimento para avaliação dos parâmetros fisiológicos no modelo de isquemia global do coração isolado.

A frequência cardíaca foi obtida a partir dos registros de pressão sistólica (frequência cardíaca espontânea), expressa em batimentos por minuto (BPM). A resistência coronariana também foi aferida pela medida dada por outro transdutor, de mesmo modelo, acoplado à coluna com Krebs. O fluxo coronariano foi avaliado minuto a minuto pelo volume (mL) do perfusato, obtido nas fases de estabilização e reperfusão.

Ao término do experimento cada coração foi retirado da cânula e seccionado em 4 cortes transversais, alguns cortes foram guardados em microtubos e armazenados à -80ºC para posteriores análises. Para a marcação do infarto as secções do ápice e da base dos corações foram desprezadas.

Análise da Dimensão da Região Infartada

Para avaliação macroscópica do tamanho do infarto, os corações foram tratados com cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), seccionados (± 2 µm) e incubados em solução de TTC 1% (diluído em solução de Krebs-Ringer) durante 10 min. Após esse período, os cortes foram mergulhados em solução de formalina tamponada por 30 min, para a remoção do excesso da coloração. Em seguida, os tecidos foram digitalizados e as imagens analisadas com o software ImageJ 1.38x (NIH), sendo as mesmas normalizadas pelo tamanho do coração.

Avaliação do Índice de Severidade da Arritmia

As arritmias cardíacas foram avaliadas como a presença de taquicardia e/ou fibrilação ventricular nos primeiros 30 min de reperfusão. Para obter uma medida quantitativa, as arritmias foram classificadas arbitrariamente por sua duração. A ocorrência de arritmias cardíacas de até 3 min foi classificada com o fator 2; 3-6 min foi classificada com fator 4; 6-10 min foi classificada com fator 6; 10-15 min foi classificada com o fator 8; 15-20 min foi classificada com o fator 10; 20-25 min foi classificada com o fator 11; e de 25-30 min classificada com o fator 12. Entretanto, se maior ou igual há 30 min foi considerada uma arritmia irreversível (FERREIRA, SANTOS, ALMEIDA, 2001),

Determinação do Grau de Peroxidação Lipídica

A mensuração dos produtos de peroxidação lipídica foi feita de acordo com Bose et al. (1989). Resumidamente, as amostras foram pesadas e homogeneizadas em 10 vezes o volume de solução de tampão fosfato (50 mmol, pH 7,4), contendo butil-hidroxitoluol (BHT; 12,6 mmol). Em seguida, 200 μL do homogenato foram incubados a 90ºC por 45 min com solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA 0,37%), em meio ácido (15% de ácido tricloroacético- TCA e 0,25 N de ácido clorídrico). As amostras, em seguida, foram centrifugadas por 5 min a 14.000 rpm. Ao sobrenadante, acrescentou-se n-butanol e solução saturada de NaCl. A mistura foi agitada em vórtex por 30 seg e novamente centrifugada a 14.000 rpm (Heal Force, Neofuge 15R) por 2 min. Alíquotas do sobrenadante foram

pipetadas em placas de 96 poços para a leitura de absorbância em leitor de microplaca (Biotek, ELx800 Absorbance Microplate Reader) a 535 nm, corrigindo pelos valores de absorbância a 572 nm. A quantidade de MDA produzida foi expressa em nanomols por gramas de tecido, e foi interpretada como marcador de peroxidação lipídica formado pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) (GAY & GEBICKI, 2000).

Mensuração de Hidroperóxidos Totais

A quantificação dos hidroperóxidos totais foi realizada de acordo com Jiang et al. (1992). O método se baseia basicamente na oxidação de íons ferroso (Fe^{2+}) a íons férricos (Fe^{3+}) em condições ácidas, pelos hidroperóxidos lipídicos. O indicador utilizado é o xilenol orange que reage com os íons Fe^{3+} produzindo um cromóforo azul-arroxeado, o qual pode ser medido espectrofotometricamente a 560 nm. O ensaio foi realizado em reagente de FOX, o qual é composto por xilenol orange (0,25 mmol), sulfato ferroso amoniacal ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$, 0,25 mmol), hidroxitolueno butilado (BHT, 4,4 mmol), metanol (CH_4O) e ácido sulfúrico (H_2SO_4, 97%). Em um microtubo foi adicionado reagente de FOX ao homogenato. Após 30 minutos, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante colocado em microplaca. A quantificação dos hidroperóxidos foi expressa em mol/L, foi utilizado o coeficiente de extinção molar 4,3 x 10^{-4} M^{-1} cm^{-1}.

Medida de grupamentos sulfidrila

Para medida de oxidação de grupamentos tiol de proteínas e peptídeos foi avaliado as concentrações de grupamentos sulfidrila. As amostras foram incubadas com 3 mmol de ácido 6,6′-dinitro-3,3′-ditiodibenzoico (DTNB) por 10 min, e após 5 min de centrifugação a 1000 rpm (Neofuge 15R, HEAL FORCE®) foram lidas em espectrofotômetro a 412 nm. Foi construída uma curva padrão de cisteína para comparação (SEDLAK et al, 1968).

Determinação da Atividade da Enzima Superóxido Dismutase

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi mensurada através da formação de $O_2^{\cdot-}$ pela auto-oxidação do pirogalol e a inibição da redução do sal de tetrazolium (MTT) segundo Madesh e Balasubramanian (1998). Resumidamente, o tecido foi homogeneizado em tampão fosfato (PBS 50 mmol, pH 7,4), centrifugado a 12.000 rpm (Heal Force, Neofuge 15R) por 30 minutos. A reação foi realizada pipetando em placa de Elisa: o sobrenadante obtido, PBS, MTT (1,25 mmol) e pirogalol (100 μmol). A microplaca foi agitada por 5 min e logo após acrescentou-se dimetilsulfóxido (DMSO). A leitura foi realizada em leitor de microplaca (Biotek, ELx800 Absorbance Microplate Reader) a 570 nm. A atividade da SOD foi expressa em unidade de SOD por mg de proteína.

Determinação da Atividade da Enzima Catalase

A atividade da enzima foi determinada em tampão fosfato (50 mmol, pH 7,0). Alíquotas do homogeneizado foram adicionadas ao tampão fosfato e a reação iniciada com a adição de 0,3 molar H_2O_2. As medidas foram realizadas em intervalos de 20 s (0, 20, 40 e 60 s) em cubeta de quartzo, imediatamente após o início da reação, a 25ºC, em espectrofotômetro (Hitachi, Japão), com comprimento de onda de 240 nm. A atividade da CAT foi calculada utilizando a fórmula ΔE/min/mg proteína. Onde, ΔE é o valor da variação da absorbância entre a primeira e a quarta leitura (GIODA et al, 2010).

Avaliação da Atividade da Enzima Glutationa Peroxidase

Amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio 50 mmol acrescido de KCl 140 mmol; pH 7,4. Centrifugação a 12.000 rpm por 30 min à 4ºC. Outros reagentes utilizados no ensaio, nesta respectiva ordem: tampão fosfato de sódio 100 mmol contendo ácido etilenodinitrilo tetra-acético - EDTA 5 mmol; NADPH 8,4 mmol; glutationa redutase (GR); ázida sódica 1,125 mol; glutationa reduzida (GSH) 0,15 mmol; peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 2,2 mmol.

Este é um tipo de ensaio cinético que avalia a atividade da GPx ao longo do tempo de acordo com o consumo do NADPH, através da oxidação do mesmo. A leitura foi realizada no espectrofotômetro de placa à 340 nm, à 25ºC, durante 6 min, com uma nova leitura a cada 1 min (FLOHÉ & GUNZLER, 1984).

Determinação da concentração total de proteína

A concentração total de proteínas foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951). Os tecidos foram preparados conforme o protocolo de preparação do tecido para análises enzimáticas e, posteriormente, parte do sobrenadante foi utilizado. As amostras foram diluídas 10x em água deionizada. Também foram preparadas amostras padrão, com quantidades conhecidas de albumina, a fim de confeccionar uma curva padrão de albumina. Tanto a amostra diluída, quanto diluições crescentes do padrão de albumina foram colocadas em microplaca de 96 poços, em triplicata. A pipetagem era realizada rapidamente em ambiente com meia luz e posteriormente a placa era totalmente protegida da luz e levada para análise em leitor de Elisa, onde a placa era agitada durante 30 segundos e a leitura realizada em seguida em 630 nm.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análises dos dados foram utilizados os softwares Microsoft Office Excel 2007 e Prism 5.1. (GraphPad, San Diego, CA, USA). Considerou-se valor estatisticamente significante $p < 0,05$.

O acompanhamento do peso dos animais durante o tratamento, por ser um dado paramétrico foi expresso através da média e desvio padrão. Para os dados obtidos na avaliação dos parâmetros cardíacos e dos ensaios enzimáticos utilizou-se o teste de análise de variância ANOVA de uma via, com objetivo de comparar três ou mais grupos pareados e ANOVA duas vias, no ensaio de sequestro do radical DPPH. Em seguida, aplicou-se o teste de Tukey, para análise da comparação múltipla, que permite testar qualquer contraste, entre duas médias de tratamentos.

O potencial antioxidante do CAR foi avaliado através do sequestro do radical livre DPPH. A Figura 19 apresenta o efeito antioxidante de CAR nas doses de 35, 55 e 75 μg/mL com atividade maior na dose de 35 μg/mL(43,8%), de maneira dependente do tempo.

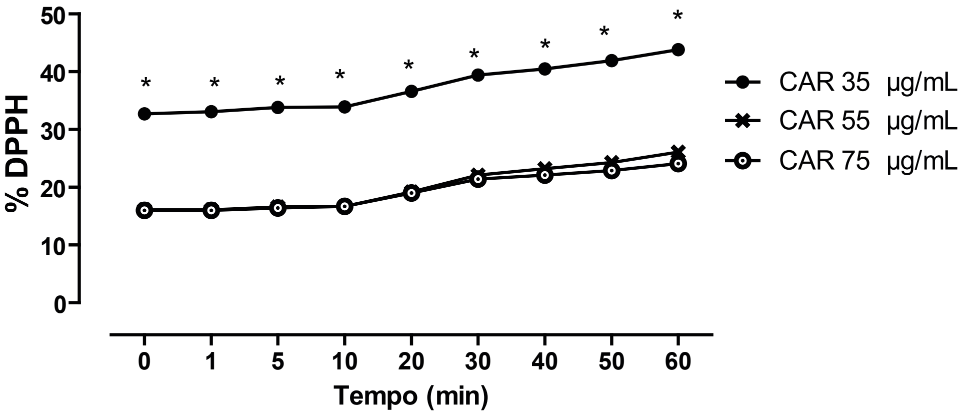


Figura 19. Percentual de sequestro do radical DPPH pelo carvacrol (CAR) em diferentes concentrações. ANOVA de duas vias, seguida do teste Tukey. * $p < 0,05$.

CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO CAR/Β-CD

Os espectros das amostras da mistura física, malaxagem e coevaporação mostraram bandas de estiramento OH na região 3750-3000 cm^{-1} características de β-CD e CAR. Contudo, no complexo CAR/β-CD obtido por coevaporação, esta banda foi mais intensa indicando a complexação (Figura 20). Além disso, foi observado na região de 3000-2750 cm^{-1} uma banda assimétrica de estiramento CH mais intensa no coevaporado, sugerindo a presença do CAR complexado.

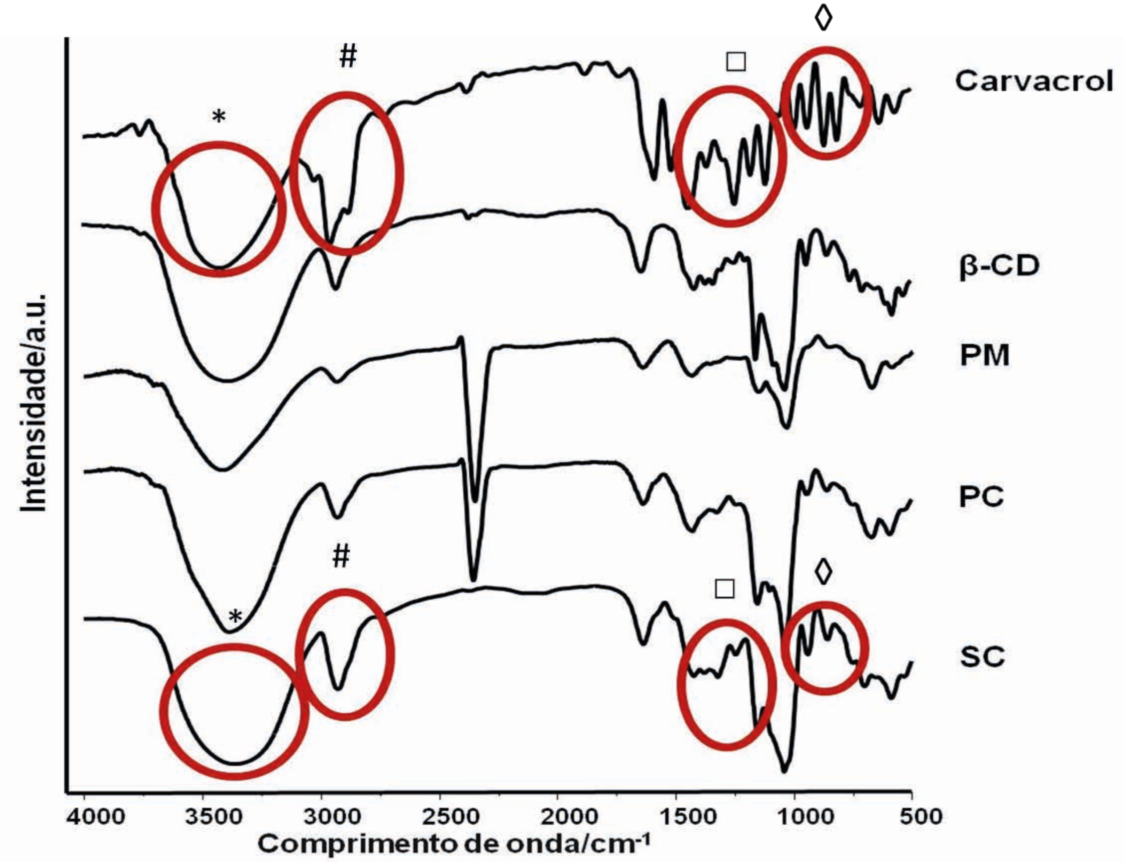


Figura 20. Espectros de infravermelho de β-CD: β-ciclodextrina, PM: mistura física e complexos de inclusão por malaxagem (PC) e coevaporação (SC) preparadas em brometo de potássio obtidos por espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (FTIR). * 3750-3000 cm^{-1}, # 3000-2750 cm^{-1}, □ 1400-1250 cm^{-1}, ◊ 750 cm^{-1}.

A evidência de complexação é apontada no intervalo de 1400-1250 cm^{-1} pelo método coevaporação, onde apresentou uma banda característica do carvacrol (Figura 18). Outra banda importante foi observada no intervalo de 815 cm^{-1}, uma banda harmônica do grupo alceno presente na molécula de CAR. No entanto, a banda observada em 750 cm^{-1} nos espectros de mistura física (PM) e malaxagem (PC) e que não foi observada no espectro de β-CD é característica de CAR.

A Figura 21 mostra os difratogramas de raios X da β-CD, mistura física, malaxagem e coevaporação os quais exibiram uma série de picos finos e intensos, que são indicativos de cristalinidade. O perfil de cristalinidade da mistura física foi similar ao da β-CD. Próximo a 21,7 θ a malaxagem e coevaporação demonstraram um novo pico de cristalinidade. Em 36,1 θ foi observado um pico em coevaporação diferente dos outros difratogramas. Assim,

alguns picos foram similares no difratograma da β-CD e estes podem ser explicados porque a β-CD foi o único cristal no sistema, uma vez que o CAR é um óleo.

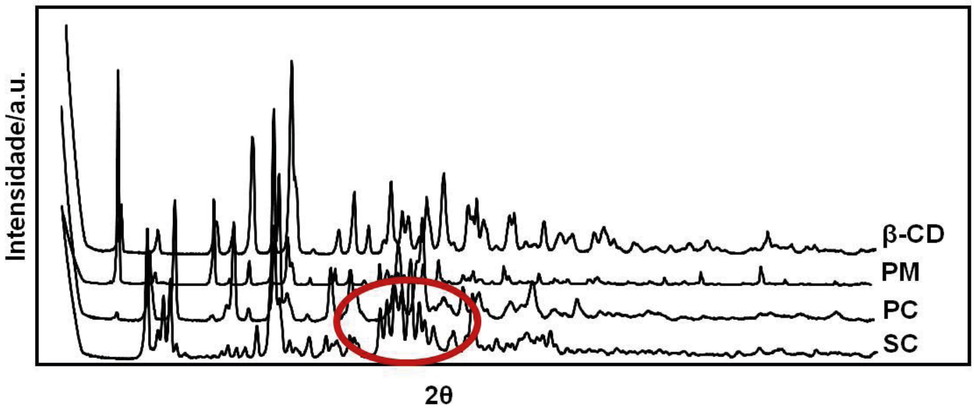


Figura 21. Difratograma da β-ciclodextrina (β-CD), mistura física (PM) e complexos de inclusão malaxagem (PC) e coevaporação (SC).

A quantidade de carvacrol complexado para cada método de complexação foi determinada por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CG/EM). A concentração de carvacrol complexado na cavidade da β-CD foi calculada pela subtração da quantidade do carvacrol total e do valor do carvacrol adsorvido à superfície. Como mostrado na Tabela 1, a complexação mais eficiente de carvacrol ocorreu nos métodos malaxagem e coevaporação, com 17,54% de carvacrol na cavidade complexada por este método. Adicionalmente, os resultados de perdas de massa obtidos por termogravimetria derivada (TG/DTG), bem como, percentual de água determinado por Karl Fisher (KF) estão expressos na Tabela 1.

Como pode ser visto na Figura 22, a perda de massa foi determinada no intervalo de 28-100ºC, 100-300ºC e 300-500ºC. Foi observado que a maior decomposição na amostra do monoterpenóide ocorreu na faixa de 100-190ºC seguida da degradação. A β-CD demonstrou perda de massa de 13,48% na primeira etapa.

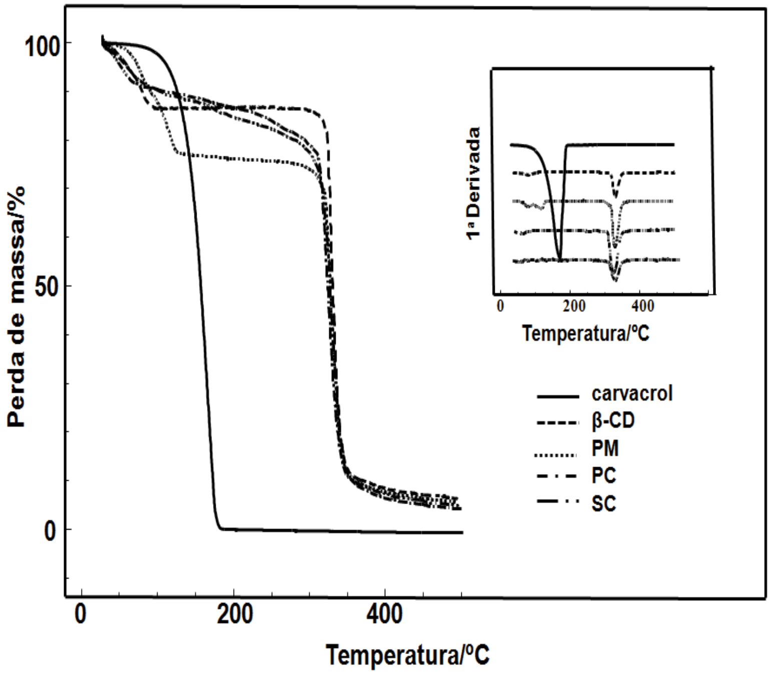


Figura 22. Perda de massa de carvacrol, β-ciclodextrina (β-CD), mistura física (PM) e complexos de inclusão, malaxagem (PC) e coevaporação (SC).

Amostras	Perda de Massa (%)			Umidade	Caracterização físico-química da complexação			
	Estágio 1 28-100ºC	Estágio 2 100-300ºC	Estágio 3 300-500ºC	H_2O	Superfície carvacrol	Total carvacrol	% de carvacrol complexado	Razão de Complexação
Carvacrol	2,00 ± 1,07	98,00 ± 0,12	0,15 ± 0,14	2,02 ± 0,61	-		-	-
β-CD	13,48± 0,28	0,92 ± 0,72	79,33 ± 0,62	12,77 ± 1,47	-	-	-	-
PM	14,59 ± 2,23	13,11 ± 0,57	67,76 ± 1,82	12,21 ± 0,68	96,92	96,55	-0,37	não
PC	8,45 ± 2,79	11,24 ± 0,20	74,26 ± 0,69	11,86 ± 0,02	87,65	96,18	8,53	1:0,1
SC	9,70 ± 0,23	12,96 ± 1,12	72,71 ± 0,34	9,84 ± 1,10	77,92	95,46	17,54	1:0,2

Tabela 1. Caracterização físico-química do carvacrol livre, β-ciclodextrina (β-CD), mistura física (PM), malaxagem (PC) e coevaporação (SC). Análise termogravimétrica, teor de umidade e razão de complexação.

PERFUSÃO DO CORAÇÃO ISOLADO

À função sistólica diz respeito ao inotropismo ou contratilidade, que traduz o desempenho do coração frente a uma determina pré-carga e pós-carga e pode ser quantificado relacionando-se as variáveis: Pressão desenvolvida no ventrículo e tempo de encurtamento, tempo decorrido para que se eleve a pressão intraventricular ao máximo

(BULLOCK, BOYLE, WANG, 1995).

Os parâmetros cardíacos contráteis foram analisados em corações isolados de animais nos diferentes grupos experimentais durante a estabilização e reperfusão. Estes parâmetros incluem frequência cardíaca espontânea (FC), pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo (PDVE), fluxo coronariano e índice de severidade de arritmia (ISA). Na Tabela 2 encontram-se sumarizados os valores médios de algumas destas medidas coletadas.

Grupos Experimentais	Estabilização		Reperfusão	
	FC (BPM)	PDVE (cmHg)	FC (BPM)	PDVE (cmHg)
Salina	356,3 ± 20,9	8,8 ± 7,8	273,8 ± 89,2	18,5 ± 12,2
CAR/β-CD 25	362,1 ± 49,6	9,6 ± 2,1	354,6 ± 12,7	53,2 ± 21,2$^{*\#}$
CAR 25	371,7 ± 7,9	13,3 ± 9,0	361,4 ± 5,4	29,0 ± 6,4

Tabela 2. Frequência cardíaca (FC) e pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo (PDVE) aferidos durante a estabilização e reperfusão do coração isolado de animais pré-tratados por 7 dias com carvacrol (CAR), salina (veículo) e complexo de inclusão (CAR/β-CD), submetidos à isquemia cardíaca global e reperfusão (n = 5 por grupo). Valores expressos em média ± desvio padrão. ANOVA uma via, seguida do teste Tukey. * p<0,0001 vs CAR 25; $^{\#\#\#}$p<0,0001 *vs* Salina.

O pré-tratamento dos animais com CAR/β-CD 25 mg/Kg conferiu melhor desempenho cardíaco após a lesão de isquemia e reperfusão quando comparado aos grupos veículo, CAR 25 (69,6±1.4 *vs* 34,1±4.7%) e salina, ocorrendo aumento significativo da PDVE (Tabela 2 e Figura 23).

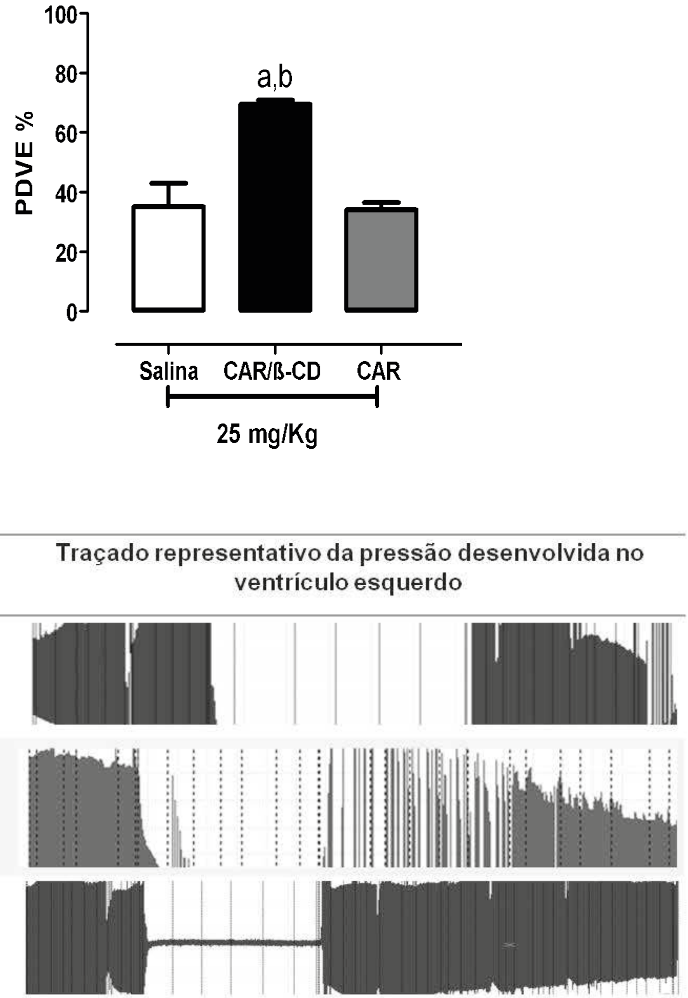


Figura 23. Pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo (PDVE) expressa em percentual, acima e seu traçado representativo, abaixo. Animais pré-tratados por 7 dias com carvacrol (CAR), veículo (salina) e complexo de inclusão (CAR/β-CD), submetidos à isquemia cardíaca global e reperfusão (n = 5 por grupo). Valores expressos em média ± desvio padrão. ANOVA uma via, seguida do Teste Tukey. $^{a}p < 0{,}05$ vs Salina e $^{b}p < 0{,}05$ vs CAR 25.

A restauração do fluxo coronariano é o principal objetivo terapêutico no infarto agudo do miocárdio com supradesnivelamento do segmento ST (IAMCSST), no qual a trombose coronariana é o principal mecanismo fisiopatológico subjacente, limitando a extensão da necrose miocárdica e reduzindo a mortalidade. Existem duas formas principais de reperfusão coronariana: a química, com agentes trombolíticos, e a mecânica, através da angioplastia primária (BRASIL, 2011).

O fluxo coronariano foi medido durante a estabilização e reperfusão do coração

isolado, sendo este significativamente menor no grupo CAR 25 quando comparado ao grupo veículo (salina) como a mostra a Figura 24.

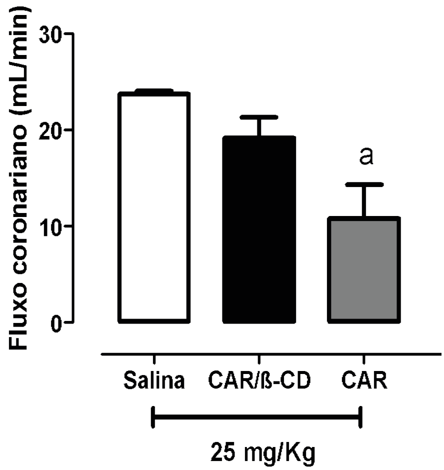
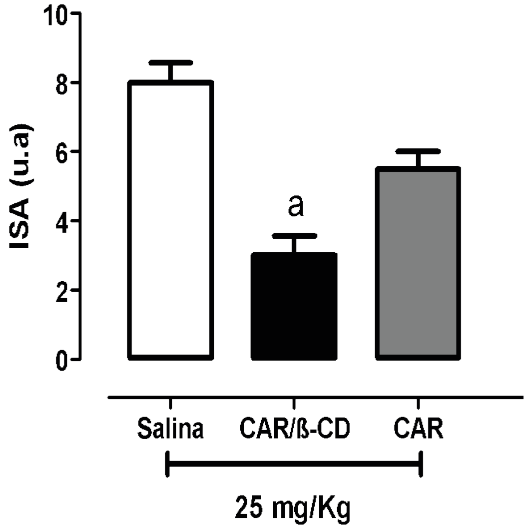


Figura 24. Fluxo coronariano aferido nos períodos de estabilização e reperfusão. Animais pré-tratados por 7 dias com carvacrol (CAR), veículo (salina) e complexo de inclusão (CAR/β-CD), submetidos à isquemia cardíaca global e reperfusão (n = 5 por grupo). Valores expressos em média ± desvio padrão. ANOVA uma via, seguida do Teste Tukey. $^{a}p < 0,05$ *vs* Salina.

O infarto do miocárdio é uma cardiomiopatia isquêmica que ocorre por uma deficiência de perfusão do tecido cardíaco, levando à necrose miocárdica. Entre as principais complicações dessa patologia estão a disfunção contrátil do ventrículo esquerdo, as arritmias, o tromboembolismo, a disfunção dos músculos papilares e a insuficiência cardíaca congestiva. Portanto, no presente estudo avaliamos a presença e severidade de eventos arrítmicos. (BOCCHI et al, 2009).

O Índice de Severidade de Arritmia (ISA) foi utilizado para classificar as arritmias ocorridas durante os registros de PDVE obtidos na reperfusão do coração isolado. O pré-tratamento com CAR complexado à β-CD, reduziu de forma significativa as ocorrências de eventos arrítmicos após isquemia cardíaca, demonstrando assim que o complexo de inclusão pode atuar na preservação do princípio ativo do CAR, pois a sua forma livre não apresentou o mesmo efeito (Figura 25).



Duração (min)	Fator
< 3	2
3-6	4
7-10	6
11-15	8
16-20	10
21-25	11
26-30	12
> 30	Irreversível

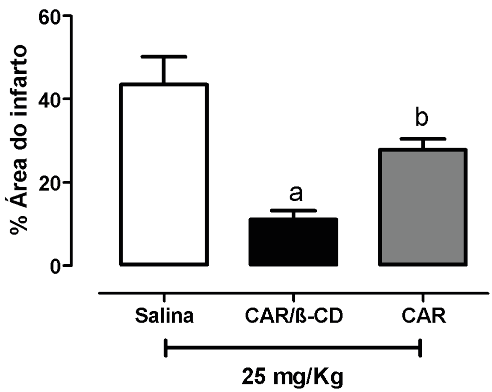
Figura 25**.** Índice de Severidade de Arritmia (ISA). Animais pré-tratados por 7 dias carvacrol (CAR), veículo (salina) e complexo de inclusão (CAR/β-CD), submetidos à isquemia cardíaca global e reperfusão (n = 5 por grupo). Valores expressos em média ± desvio padrão. ANOVA uma via, seguida do Teste Tukey. [a]p < 0,05 *vs* Salina.

MENSURAÇÃO DA ÁREA DA REGIÃO INFARTADA

O melhor método para diagnóstico *post-mortem* do infarto do miocárdio depende da fase em que ocorre a necropsia. Nos primeiros dias de necrose miocárdica o exame histopatológico pode suscitar dúvidas quanto aos limites do território necrosado. Para esta fase, o uso de trifenil-tetrazólio (TTZ) é mais preciso. Em contacto com células vivas, este corante é reduzido por desidrogenases e assume a cor vermelha escura. Células mortas, que não mais dispõem das formas reduzidas de desidrogenases, não são coradas. A colocação do miocárdio em água oxigenada ou formalina tamponada, posteriormente,

elimina a cor vermelha da hemoglobina presente no hematoma da região necrosada, clareando-a. O TTZ possibilita a caracterização da necrose imediatamente após a morte celular[64].

Os animais pré-tratados com CAR/β-CD e CAR na dose de 25 mg/Kg apresentaram significativa redução da área isquêmica, representada na foto pela coloração esbranquiçada (Figura 26) quando comparados ao veículo. Os corações do grupo CAR/β-CD apresentaram menor área de lesão quando comparado ao grupo CAR (11,1 ± 4,2% *vs* 27,8 ± 4,5% e 43,4 ± 11,6%), respectivamente, indicando que a forma complexada do CAR apresenta maior efeito cardioprotetor.



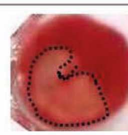
Grupo	Imagem do Coração Infartado
Salina	
CAR 25 mg/Kg	
CAR/β-CD 25 mg/Kg	

Figura 26. Área de infarto cardíaco em animais pré-tratados por 7 dias com carvacrol (CAR), veículo (salina) ou complexo de inclusão (CAR/β-CD) e submetidos à isquemia cardíaca global e reperfusão (n = 5 por grupo). Abaixo, imagens representativas dos corações infartados. Valores expressos em média ± desvio padrão. ANOVA uma via, seguida do Teste Tukey. $^{a,b}p < 0,05$ *vs* Salina.

AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A lipoperoxidação ou peroxidação lipídica é um dos parâmetros utilizados para avaliar a ocorrência de degradação de componentes lipídicos celulares nos tecidos. No presente estudo a lipoperoxidação é uma consequência da lesão de isquemia e reperfusão cardíaca. Além disso, esta medida pode indicar alteração da função hepática pelo CAR após o pré-tratamento dos animais.

O grupo CAR/β-CD 25 apresentou uma redução significativa da concentração de malondialdeídos (MDA) no tecido cardíaco após a lesão de isquemia e reperfusão, quando comparado aos grupos β-CD 25 e CAR 25, indicando assim, que o pré-tratamento com CAR/β-CD 25 mg/Kg apresentou menor degradação lipídica (Figura 27).

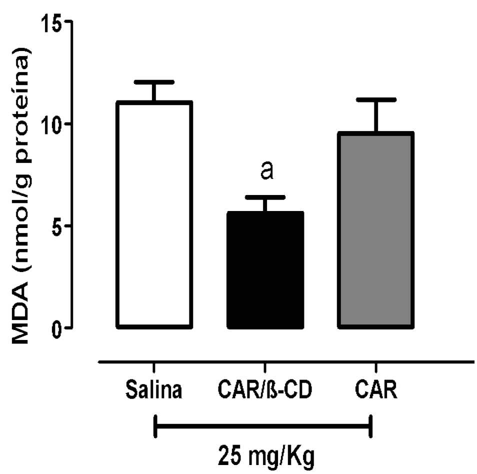


Figura 27. Peroxidação lipídica em tecido cardíaco por quantificação de malondialdeído (MDA). Animais pré-tratados por 7 dias com carvacrol (CAR), veículo (salina) e complexo de inclusão (CAR/β-CD), submetidos à isquemia cardíaca global e reperfusão (n = 5 por grupo). Valores expressos em média ± desvio padrão. ANOVA uma via, seguida do Teste Tukey. [a]p < 0,05 *vs* Salina.

Os hidroperóxidos são produtos primários da peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados, sendo indicadores importantes de fases iniciais da lipoperoxidação. O grupo CAR/β-CD 25 e CAR 25 apresentou redução significativa destes produtos no tecido cardíaco (Figura 28) quando comparado ao veículo.

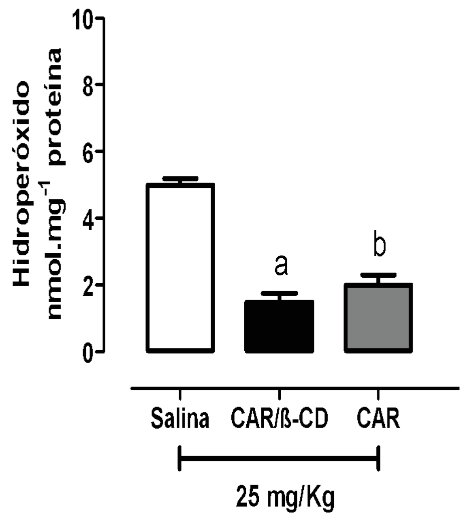


Figura 28. Dosagem de hidroperóxidos em tecido cardíaco. Animais pré-tratados por 7 dias com carvacrol (CAR), veículo (salina) e complexo de inclusão (CAR/β-CD), submetidos à isquemia cardíaca global e reperfusão (n = 5 por grupo). Valores expressos em média ± desvio padrão. ANOVA uma via, seguida do Teste Tukey. $^{a,b}p < 0,05$ *vs* Salina.

QUANTIFICAÇÃO DE GRUPAMENTOS SULFIDRILA

Os grupamentos sulfidrila são formados quando grupos tiol de dois resíduos cisteína ($C_3H_7NO_2S$) se aproximam e sofrem uma reação de oxidação gerando uma unidade de cistina ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$) com uma ligação dissulfeto (-SS-). A presença de grupos sulfidrila no sítio ativo de uma enzima contribui com a sua ativação catalítica, pois podem formar ligações covalentes com o substrato da enzima.

O grupo CAR/β-CD 25 desencadeou elevação dos grupamentos sulfidrila em comparação ao veículo. Demonstrando que o pré-tratamento na forma complexada da substância apresentou melhor efeito antioxidante, uma vez que, o aumento de grupamentos sulfidrila no tecido cardíaco indica elevação da atividade catalítica das enzimas antioxidantes (Figura 29).

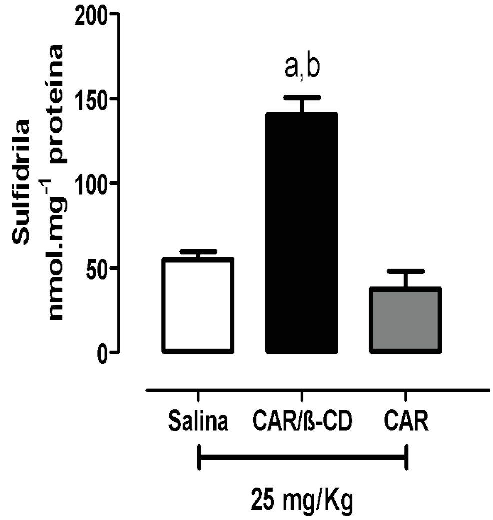


Figura 29. Quantificação de grupamentos sulfidrila em tecido cardíaco. Animais pré-tratados por 7 dias com carvacrol (CAR), veículo (salina) e complexo de inclusão (CAR/β-CD), submetidos à isquemia cardíaca global e reperfusão (n = 5 por grupo). Valores expressos em média ± desvio padrão. ANOVA uma via, seguida do Teste Tukey. $^{a}p < 0,0001$ *vs* Salina e $^{b}p < 0,05$ *vs* CAR 25.

ENZIMAS ANTIOXIDANTES

No processo de manutenção da homeostase, o organismo conta com componentes importantes que contribuem com o estado fisiológico celular, são as enzimas antioxidantes. Enzimas são proteínas com função catalítica, que aceleram as reações químicas intracelulares.

Algumas enzimas antioxidantes atuam neutralizando as EROs e outras, os radicais livres, em prol da redução e controle dos danos celulares causados por estas espécies químicas. As enzimas antioxidantes mais comumente estudadas são SOD, CAT, GPx e GR. Estas estão presentes em vários tecidos dentre eles o cardíaco e o hepático.

Sabe-se que as moléculas antioxidantes apresentam a capacidade de doar elétrons e assim, agem estabilizando moléculas instáveis, mais comumente chamadas de radicais livres. O CAR é uma substância antioxidante que pode estar atuando dessa forma, reduzindo assim, a quantidade de EROs produzidas em grandes quantidades principalmente após a lesão de isquemia e reperfusão cardíaca.

A SOD é uma enzima antioxidante que promove a reação de conversão do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2. No presente estudo, demonstrou-se redução significativa da atividade da SOD em corações isolados dos grupos CAR 25 e CAR/β-CD 25 (Figura 30). Essa redução pode ser consequência de menor quantidade de EROs na fase de reperfusão cardíaca pela ação antioxidante do CAR.

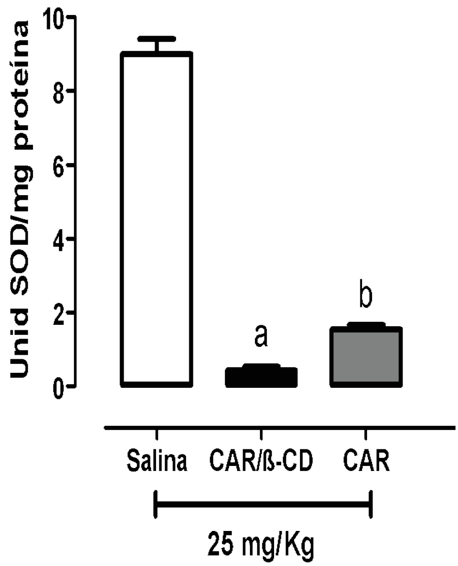


Figura 30. Atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) em tecido cardíaco. Animais pré-tratados por 7 dias com carvacrol (CAR), veículo (salina) e complexo de inclusão (CAR/β-CD), submetidos à isquemia cardíaca global e reperfusão (n = 5 por grupo). Valores expressos em média ± desvio padrão. ANOVA uma via, seguida do Teste Tukey. $^{a,b}p < 0{,}0001$ *vs* Salina.

A CAT é outra enzima antioxidante que converte o H_2O_2 em oxigênio (O_2) e água (H_2O). No coração a atividade desta enzima apresentou redução significativa somente no grupo CAR/β-CD 25 quando comparado ao veículo (Figura 31).

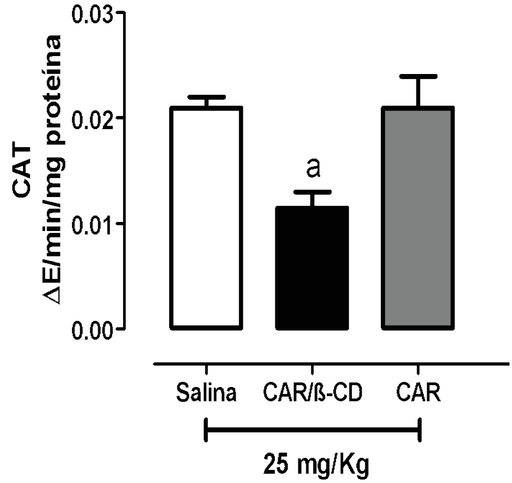


Figura 31. Atividade enzimática da Catalase (CAT) em tecido cardíaco. Animais pré-tratados por 7 dias com carvacrol (CAR), veículo (salina) e complexo de inclusão (CAR/β-CD), submetidos à isquemia cardíaca global e reperfusão (n = 5 por grupo). Valores expressos em média ± desvio padrão. ANOVA uma via, seguida do Teste Tukey. $^{a,b}p < 0,05$ *vs* Salina.

As enzimas da família glutationa apresentam em comum a dependência da molécula glutationa (GSH) como substrato. A GPx apresenta uma relação direta com a GR, fazendo parte do ciclo metabólico da GSH. Na presença de GSH a GPx produz H_2O a partir do H_2O_2, enquanto converte a glutationa reduzida em glutationa oxidada (GSSG). A GR, na presença de NADPH, converte a GSSG em glutationa reduzida (GSH), mantendo assim o substrato necessário para ativar a GPx.

A atividade da GPx no tecido cardíaco apresentou aumento significativo no grupo CAR/β-CD 25 quando comparado ao CAR 25. Sabe-se que, a GPx no coração geralmente é mais ativada que a CAT, sendo assim, este resultado mostra que o pré-tratamento com CAR/β-CD 25 mg/Kg aumentou a atividade da GPx, fato que não ocorreu com o grupo CAR 25 (Figura 32).

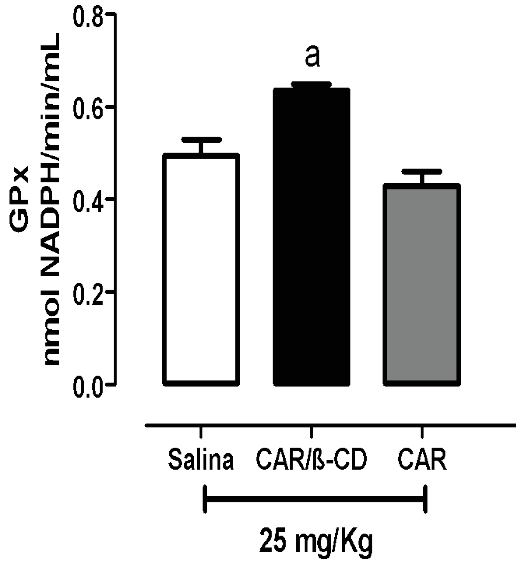


Figura 32. Atividade enzimática da glutationa peroxidase em tecido cardíaco. Animais pré-tratados por 7 dias com carvacrol (CAR), veículo (salina) e complexo de inclusão (CAR/β-CD), submetidos à isquemia cardíaca global e reperfusão (n = 5 por grupo). Valores expressos em média ± desvio padrão. ANOVA uma via, seguida do Teste Tukey. $^{a}p < 0,05$ *vs* CAR 25.

DISCUSSÃO

A maioria das plantas medicinais apresenta potencial antioxidante por conter diversos compostos orgânicos biologicamente ativos, dentre eles, os monoterpenos. Os extratos da planta *P. granatum* e o seu óleo essencial apresentaram atividade antioxidante de forma concentração-dependente, avaliadas através do método de sequestro do radical DPPH. No óleo essencial foram encontrados 19 componentes, incluindo endo-borneol e α-terpineno[65]. (HADRICH et al, 2014).

Neste estudo, o CAR apresentou atividade antioxidante *in vitro* (Figura 18) e o maior percentual antioxidante (43,8%) foi obtido na concentração de 35 µg/mL em 60 min, estes resultados são corroborados por estudos publicados recentemente (SARRAZIN et al, 2015; MITROPOULOU et al, 2015).

Elevada atividade antioxidante foi encontrada no óleo de *Lippia origanoides Kunth* no qual o principal constituinte é o carvacrol (47,2%). Além deste, foram ainda encontrados o timol (12,8%), p-cimeno (9,7%), e p-methoxythymol (7,4%). A atividade antioxidante deste óleo mostrou-se elevada, com a inibição do DPPH radical de 15 a 82%, em concentrações de 5 a 50 µg/m (SARRAZIN et al, 2015).

De forma similar, o óleo essencial *Origanum dictamnus* mostrou elevada atividade antioxidante, sendo também o carvacrol (52,2%) seu constituinte majoritário. A atividade sequestradora de radicais livres do óleo essencial foi atribuída principalmente ao carvacrol. Outros constituintes identificados neste óleo foram γ-terpineno (8,4%), p-cimeno (6,1%), linalol (1,4%), e cariofileno (1,3%) (MITROPOULOU et al, 2015).

A evidência de complexação obtida nos espectros de espectroscopia de absorção na região do infravermelho, é apontada em quatro intervalos de 3750-3000, 3000-2750, 1400-1250 e 815 cm^{-1} pelo método coevaporação, onde apresentou bandas característica do carvacrol (Figura 20). A banda encontrada no intervalo de 1000-1300 cm^{-1} é característica do grupo éter pertencente a β-CD e foi observada nos espectros da mistura física e malaxagem. Estes resultados mostram a presença do CAR na β-CD, preferencialmente no método coevaporação.

Na figura 21 os difratogramas de raios X da β-CD, mistura física, malaxagem e coevaporação exibiram uma série de picos finos e intensos, indicativos de cristalinidade. Este resultado mostra a formação de uma fase cristalina nos difratogramas de malaxagem e coevaporação em relação à β-CD com o desaparecimento de alguns picos espectrais desta substância. Mangolim e colaboradores (2014) demonstraram que a formação da fase cristalina é característica da formação de complexos de inclusão entre a curcumina e β-CD. Esses resultados indicam a complexação do CAR à β-CD pelo método de coevaporação.

Na figura 22 é apresentada a perda de massa nas amostras de CAR, β-CD, mistura física, malaxagem e coevaporação determinadas nos intervalos de temperatura de 28-100ºC, 100-300ºC e 300-500ºC. A primeira etapa demonstrou a perda de massa de 2% de CAR, que esta de acordo com valor de KF, indicando umidade na amostra. A β-CD demonstrou perda de massa de 13,48% na primeira etapa, relacionada a liberação de moléculas de água na sua superfície. Isto reforça o valor de titulação de KF (12,77 ± 1,47%). Na segunda etapa, a β-CD mostrou o baixo percentual de perda de massa e esse resultado corrobora outros estudos (FOLCH-CANO et al, 2014; MENEZES et al, 2014).

Como mostrado na tabela 1, houve complexação mais eficiente de CAR para malaxagem e coevaporação, com 17,54% desta substância na cavidade complexada por coevaporação. A mistura física não apresentou resultados significativos, o que corrobora os resultados de FTIR e DRX. Estes resultados condizem com estudo de Higueras e colaboradores (2013) que demonstraram a formação de complexo de inclusão entre o CAR e hidroxi-propil-β-ciclodextrina (HPpCD) (HIGUERAS et al, 2013).

O complexo de inclusão do CAR por coevaporação apresentou perda de massa, entre 190-300ºC, igual a 7,89 ± 0,17%, provavelmente atribuída ao CAR complexado, uma vez que o monoterpenóide livre foi decomposto até 190ºC (Tabela 1). Além disso, a titulação de KF mostrou uma redução no conteúdo de água do coevaporado e isto é uma evidência da complexação, no qual moléculas de água da cavidade da β-CD podem ter sido substituídas por moléculas de CAR. Na malaxagem a amostra apresentou perda de massa de 7,98 ± 0,15% e na mistura física, 2,0 ± 0,13%, no intervalo de 100-140ºC, indicando que a coevaporação foi o melhor método para a inclusão do CAR. Estes dados corroboram outros trabalhos publicados. Santos e colaboradores comprovaram a complexação entre CAR e β-CD pelo método da liofilização mediante uso de outras técnicas analíticas (SANTOS et al, 2015).

A lesão de isquemia-reperfusão do miocárdio é uma causa importante de prejuízo para a função cardíaca no pós-operatório imediato de cirurgias cardíacas. Ocorre um aumento na geração de EROs tanto durante a isquemia quanto na reperfusão e estas espécies químicas desempenham papel central na fisiopatologia da lesão miocárdica intra-operatória (RAEDSCHELDERS et al, 2012).

Produtos naturais ou análogos estruturais com diversas estruturas são fontes para a descoberta de novos agentes terapêuticos. O estudo de compostos fenólicos ou terpenóides pode contribuir com o desenvolvimento de estratégias eficientes para promover a apoptose e estado redox em diversas condições patológicas (MUKHERJEE et al, 2015).

Em nosso trabalho foi verificado que o pré-tratamento com CAR complexado à β-CD apresentou cardioproteção da função contrátil na dose de 25 mg/Kg. Na reperfusão

foi observado melhor recuperação da PDVE no grupo CAR/β-CD 25 quando comparado aos grupos CAR 25 e salina, indicando que o pré-tratamento com CAR/β-CD 25 auxilia o desempenho contrátil na fase de reperfusão (Tabela 2 e Figura 23).

Aydin e colaboradores (2007) investigaram o efeito do CAR no sistema cardiovascular e evidenciaram que tal substância desencadeia efeito hipotensor e bradicárdico, dependente de dose (1, 10 e 20 μg/Kg). Além disso, relacionaram o efeito hipotensor a vasodilatação em aorta, uma vez que, essa substância bloqueia canais para cálcio sensíveis a voltagem, em células musculares lisas vasculares[73]. Os nossos resultados discordam com este autor por demonstrarem que não houve diferença significativa na frequência cardíaca após lesão de isquemia e reperfusão cardíaca, cujo valor de p foi 0,07 (Tabela 2).

O fluxo coronariano foi avaliado durante a estabilização e reperfusão, este dado foi apresentado na forma total (estabilização e reperfusão) e demonstrou redução significativa em CAR 25 comparado a salina (Figura 24). Foi mostrado em outro estudo resultados semelhantes onde o pré-tratamento com Licochalcona B, também com antividade antioxidante, apresentou efeito cardioprotetor que foi relatado pela melhora da frequência cardíaca, aumento da PDVE, e diminuição do fluxo coronariano (HAN et al, 2014).

A industia farmacêutica há anos utiliza tecnologias que melhoram o efeito de fármacos e vários estudos tem comprovado a hipótese da utilização das tecnologias farmacêuticas em prol da minimização de danos hepáticos, assim como de efeitos adversos, através de métodos como complexos de inclusão e nanopartículas (NAGAOKA et al, 2015).

O tratamento com pitavastatina em formulações com nanopartículas promoveu diminuição da pressão sistólica cardíaca após 4 semanas da indução de isquemia e reperfusão global *in vivo* por ligadura da artéria coronária esquerda anterior descendente. A pitavastatina-NP induziu a fosforilação de Akt e GSK3β, e inibiu a inflamação e apoptose de cardiomiócitos na lesão de isquemia e reperfusão do miocárdio[75]. De forma diferente, a perfusão de picroside II, antes da reperfusão cardíaca, no sistema Langendorff resultou na alteração dos parâmetros da função cardíaca avaliados, apresentando diminuição da frequência cardíaca, índice de contratilidade, índice de relaxamento e PDVE (WU et al, 2014).

Na avaliação do índice de severidade de arritmias (ISA) representada na Figura 25, o grupo CAR/β-CD 25 apresentou redução significativa quando comparado a salina, demonstrando o efeito antiarrítmico do CAR, que foi potencializado pela complexação à β-CD.

Salvia miltiorrhiza, um componente muito importante da medicina tradicional chinesa, pode promover a circulação sanguínea e aliviar a estagnação do sangue. S. miltiorrhiza é amplamente usado no tratamento de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares

tais como doença cardíaca coronária e acidente vascular encefálico. Tanshinona II (A), terpeno, principal componente lipofílicos extraído da raiz de S. miltiorrhiza, possui atividade antiaterosclerose, anti-hipertrofia cardíaca, antioxidante e antiarritmia. Concordando assim, com os nossos resultados os quais demonstraram atividade antiarrítmica e antioxidante do CAR (CHEN, GUO, ZHANG, 2015).

No presente estudo, houve redução significativa da região do infarto nos grupos CAR/β-CD 25 e CAR 25 quando comparado a salina, indicando o efeito cardioprotetor do CAR, tanto em sua forma livre quanto complexada, (11,1±4,2; 27,8±4,5; 43,4±11,6%) conforme apresentado na Figura 26. Este resultado indica que o princípio ativo do CAR pode estar sendo preservado por mais tempo quando o mesmo se encontra em complexo de inclusão à β-CD.

Yu, Liu e Zhu (2013) mostraram que o pré-tratamento com carvacrol livre nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg reduziu em 10%, 15% e 18% respectivamente a dimensão da área do infarto do miocárdio em coração de ratos submetidos a isquemia global ex vivo, se comparado ao grupo veículo. Estes autores relatam ainda que a redução da área infartada foi dependente de concentração[13]. Apesar da redução do infarto ter sido maior na dose de 100 mg/Kg, pode-se notar que este efeito não foi tão significativo quando observado o tratamento com 50 mg/Kg. Sabe-se ainda que, a administração de drogas em doses mais altas pode promover uma sobrecarga hepática e levar alguns hepatócitos à falência. Nossos resultados concordam com estes autores, além de demonstrar que a complexação do CAR à β-CD favorece o seu efeito bioativo, podendo utilizar doses menores para obter resposta eficaz.

A peroxidação lipídica verificada por quantificação de MDA em coração (Figura 27) apresentando redução significativa no grupo CAR/β-CD 25 quando comparado ao veículo. Enquanto que, na dosagem de hidroperóxidos em coração (Figura 28) houve redução significativa nos grupos CAR/β-CD 25 e CAR 25 comparado ao veículo.

Estes resultados são semelhantes aos apresentados no estudo de Yu, Liu, Zhu (2013) os quais mostraram que o pré-tratamento com CAR livre reduziu a concentração de MDA nas doses de 25 (3,04 ± 0,22 nmol/mg proteína), 50 (2,76 ± 0,26 nmol/mg proteína) e 100 mg/Kg (2,35 ± 0,33 nmol/mg proteína) quando comparado ao veículo (5,58 ± 0,44 nmol/mg proteína), demonstrando que o efeito é dependente de concentração.

No presente estudo, os danos às proteínas foram avaliados pela medida de grupamentos sulfidrila. Esta medida apresentou elevação em coração no grupo CAR/β-CD 25 quando comparado a salina e CAR 25 (Figura 29). Estes resultados indicam que a degradação proteica no tecido cardíaco após a lesão isquêmica foi menor nos grupos dos animais pré-tratados com CAR/β-CD, indicando assim, efeito cardioprotetor do complexo

de inclusão CAR/β-CD pela provável diminuição das EROs no meio intracelular dos cardiomiócitos após I/R.

A atividade enzimática da SOD apresentou redução significativa no coração em CAR/β-CD 25 e CAR 25 quando comparado ao veículo (Figura 30). Tais resultados se assemelham aos de Yu, Liu e Zhu (2013) os quais mostraram que o pré-tratamento com CAR livre reduziu a atividade da SOD nas doses de 25 (20,76 ± 1,11 U/mg proteína), 50 (22,34 ± 1,14 U/mg proteína) e 100 mg/Kg (23,08 ± 1,15 U/mg proteína) quando comparado ao veículo (24,70 ± 1,53 U/mg proteína), sendo que a menor dose apresentou uma maior redução da atividade desta enzima (YU, LIU, ZHU, 2013).

Han e colaboradores (2014) mostraram que a atividade da SOD medida em coração de animais pré-tratados com Licochalcona B após isquemia e reperfusão aumentaram, ao passo que os níveis de MDA diminuiram. Além disso, a área do infarto e a apoptose nestes corações foram menores quando comparadas ao grupo tratado com o veículo[74]. Este estudo indica que o aumento da atividade destas enzimas pode ser cardioprotetora. A diferença entre este trabalho e os nossos resultados pode ser explicada devido ao fato de que o CAR neutralize as EROs que atuam como substrato desta enzima.

A atividade enzimática da CAT apresentou-se reduzida de forma significativa em coração no grupo CAR/β-CD 25 quando comparado a β-CD 25 (Figura 31). O substrato da CAT é o H_2O_2, uma das espécies reativas de oxigênio não-radicalar. O CAR é uma substância antioxidante que pode estar agindo doando elétrons para radicais livres ou ERO radicalares, que são moléculas instáveis, a exemplo do O_2^-.

A GPx é outra enzima antioxidante endógena que catalisa o mesmo substrato da CAT, ou seja, também converte 1 H_2O_2 em 2 moléculas de H_2O na presença da GSH. A atividade da GPx no tecido cardíaco, apresentou elevação significativa no grupo CAR/β-CD 25 quando comparado a CAR 25 (Figura 32). No miocárdio a GPx apresenta maior sensibilidade à elevação dos níveis de H_2O_2 intracelular em comparação com a CAT, desta forma pode-se explicar o aumento da atividade enzimática da GPx e a redução da atividade catalítica da CAT.

Yu, Liu e Zhu (2013) mostraram em animais que sofreram I/R, o pré-tratamento com carvacrol livre nas doses de 25 (4.82±0.49 μg de GSH oxidada/min/mg proteína), 50 (5.27±0.33) e 100 mg (5.77±0.46) elevou a atividade da GPx comparado ao veículo (3.27±0.21), sendo este efeito, dependente de concentração. Os resultados deste trabalho corroboram com os nossos dados acima mencionados (YU, LIU, ZHU, 2013).

Catalpol é um terpeno presente em plantas do gênero *Scutellaria albida* e *Paulownia tomentosa*, família *Lamiaceae*, mesma família do CAR. O pré-tratamento com catalpol (5 mg/Kg, i.p., 5 min antes da reperfusão) melhorou significativamente as funções cardíacas,

reduziu o infarto do miocárdio, apoptose e necrose dos cardiomiócitos após 30 min de isquemia e 3 h de reperfusão (todos $p < 0{,}05$). Enquanto isso, a formação de peroxinitrito foi marcadamente reduzida após tratamento catalpol (3,01 ± 0,22 vs 4,66 ± 0,53 pmol/mg de proteína no veículo, $p < 0{,}05$). Além disso, catalpol aumentou a fosforilação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), aumentando a síntese de óxido nítrico (NO) que é uma das principais substâncias vasoditaladoras (HUANG et al, 2013).

Assim, podemos afirmar que a melhora na função cardíaca, redução da área de infarto, e diminuição de moléculas envolvidas com danos à proteínas e lipídeos, como peroxinitrito e MDA e hidroperóxidos totais, são aspectos comumente encontrados na ação antioxidante de terpenos, a exemplo de CAR e catalpol, que apresentaram efeitos cardioprotetores.

O timol é o isômero do CAR, e apresenta atividades biológicas, dentre elas antioxidante. No modelo de infarto do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos foi realizado o pré e co-tratamento com o timol 7,5 mg/Kg/dia, durante 7 dias. O grupo veículo mostrou aumento significativo das atividades de marcadores cardíacos de diagnóstico, peroxidação lipídica, cálcio, e redução nas atividades de SOD, CAT, GPx, glutationa reduzida, isocitrato, malato, α-cetoglutarato e NADH-desidrogenases, citocromo C-oxidase, e trifosfato de adenosina. O pré e co-tratamento com timol mostraram efeitos próximos aos normalizadas sobre todos os parâmetros bioquímicos estudados. Os nossos resultados concordam com esse achado científico, sendo que o pré-tratamento com CAR reduziu as atividades da SOD e CAT, assim como ocorreu com o timol (NAGOOR, JAGADEESH, SELVARA, 2016).

Acredita-se que quando a atividade de uma enzima antioxidante não está alterada, pode-se inferir que há menos espécies reativas de oxigênio naquele local – no nosso caso através da neutralização promovida pelo CAR. Então, pode-se dizer que os grupos pré-tratados tanto com CAR complexado quanto a sua forma livre apresentaram menor concentração de EROs após a isquemia e reperfusão cardíaca global apontando efeito antioxidante, antiarrítmico e cardioprotetor do CAR.

CONCLUSÃO

O presente estudou demonstrou efeitos cardioprotetores do carvacrol complexado à β-ciclodextrina 25 mg/Kg:

- Caracterizou a formação do complexo de inclusão carvacrol/β-ciclodextrina;
- Melhorou parâmetros da função cardíaca após a lesão de isquemia e reperfusão;
- Apresentou ação antiarrítmica e redução da área de infarto cardíaco;
- Reduziu danos oxidativos em lipídeos e proteínas;
- Apresentou redução da atividade de importantes enzimas antioxidantes após a lesão de isquemia e reperfusão cardíaca.

O carvacrol pode contribuir para a ciência farmacêutica no futuro produzir um fármaco que possa ser administrado em casos de pacientes com cardiopatia aguda, como a síndrome coronariana aguda, com o objetivo de prevenção dos danos oxidativos decorrentes da lesão de reperfusão cardíaca.

REFERÊNCIAS

ACUÑA-ROUGIER, C.; OLEA-AZAR, C. Thermodynamic and geometric study of diasteroisomeric complexes formed by racemic flavanones and three cyclodextrins through NMR. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 75, 119-136; 2013.

ALPHEN et al. Effect of carvacrol on C. jejuni. *Plos One*. Volume 7, Issue 9, e45343. 2012.

ARAÚJO & FERRAZ. Impacto Econômico do Tratamento da Cardiopatia Isquêmica Crônica no Brasil. O Desafio da Incorporação de Novas Tecnologias Cardiovasculares. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* - Volume 85, Nº 1, Julho 2005.

ARISTATILE et al. Protective Effect of Carvacrol on Oxidative Stress and Cellular DNA Damage Induced by UVB Irradiation in Human Peripheral Lymphocytes. *J Biochem Mol Toxicol*. 29 (11):497-507; 2015.

AYDIN et al. Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats. *Planta Med.* 73(13):1365-71. 2007.

BACAKSIZ et al. Does pantoprazole protect against reperfusion injury following myocardial ischemia in rats? *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 17(2):269-75; 2013.

BARREIROS, et al. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova*, volume 29, nº1, 113-123, 2006.

BARRETO et al. A Systematic Review of the Wound-Healing Effects of Monoterpenes and Iridoid Derivatives. *Molecules* 19(1), 846-862; 2014.

BASER KH. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Curr Pharm Des*. 14(29):3106-19; 2008.

BELL et al. Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 50 (940-950); 2011.

BELUCI & MORAES. Inclusão Molecular de Álcool Feniletílico em β-Ciclodextrina. *BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports* - Número Especial v. 2, n. 3, p. 355-358, 2013.

BERS, Donald M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198-205; 2002.

BERWANGER et al; Bridge-ACS Investigators. Effect of a multifaceted intervention on use of evidence- based therapies in patients with acute coronary syndromes in Brazil: the BRIDGE-ACS randomized trial. *JAMA*. 307:2041-2049; 2012.

BOCCHI et al. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. *Arq Bras Cardiol.* 93;(1 Supl 1):1-71, 2009.

BONETTO, Jéssica Hellen Polleto. Efeito do Sulforafano sobre a função mecânica e parâmetros de estresse oxidativo de corações isolados de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Dissertação de mestrado em ciências biológicas. UFRGS 2015.

BRASIL. Portaria nº 2.994 do Ministério da Saúde, de 13 de dezembro de 2011.

BRASILEIRO, A. L. S. A injúria de reperfusão miocárdica. *Rev SOCERJ*. X(2):79-88; 1997.

BURT et al. Carvacrol Inhibits QS and Biofilm Formation. *Plos One*, volume 9, issue 4, e93414; 2014.

CHEN FY, GUO R, ZHANG BK. Advances in cardiovascular effects of tanshinone II(A). *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 40(9):1649-53. 2015.

COSTA et al. Estatinas e stresse oxidativo na insuficiência cardíaca crônica. *Rev Port Cardiol*. 2015.

CUNHA-FILHO, M.S.S.; SÁ-BARRETO, L.C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico*. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 28, n.1, p.1-9, 2007.

DATASUS [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2015 [cited 2015 Jan 11]. Available from: http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def

DEL RÉ & JORGE. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. *Rev. Bras. Plantas Med*. vol.14 no.2 Botucatu 2012.

ESPINOSA-DIEZETAL. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology* 6, 183-197; 2015.

FERREIRA; SANTOS; ALMEIDA. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension.* 38(3 Pt 2):665-8; 2001.

FLOHÉ & GÜNZLER. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 105:114-21; 1984.

FOLCH-CANO et al. Inclusion and Functionalization of Polymers with Cyclodextrins: Current Applications and Future Prospects. *Molecules,* 19, 14066-14079; 2014.

GAY & GEBICKI. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay. *Anal Biochem.* 284(2):217-20; 2000.

GAZIANO JM. Fifth phase of the epidemiologic transition: the age of obesity and inactivity. *JAMA*. 303:275-276; 2010.

GAZIANO TA, PAGIDIPATI N. Scaling up chronic disease prevention in- terventions in lower- and middle-income countries. *Annu Rev Public Health*. 34:317-335; 2013.

GIODA, et al. Cardiac oxidative stress is involved in heart failure induced by thiamine deprivation in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. n.6, 298: 2039-45, 2010.

GOMES et al. Pantoprazole provides myocardial protection similar to ischemic preconditioning: experimental study of isolated hearts of rats. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 26(3):433-9; 2011.

GRIENDLING & FITZGERALD. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation.*108(16):1912-6; 2003.

GUIMARÃES et al. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 107,949-957; 2010.

HADRICH et al. Antioxidant and lipase innibitory activities and essential oil composition of pomegrante peel extracts. *J. Oleo Sci*. 63, (5) 515-525 (2014).

HAN et al. Cardioprotection against Ischemia/Reperfusion by Licochalcone B in Isolated Rat Hearts. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014.

HAUSENLOY DJ, YELLON DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest.* 123(1):92-100; 2013.

HUANG ET AL. Catalpol decreases peroxynitrite formation and consequently exerts cardioprotective effects against ischemia/reperfusion insult. *Pharm Biol.* 51(4):463-73. 2013.

HYLDGAARD et al. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology.* Volume 3, Article12; 2012.

ISKESEN et al. Trimetazidine reduces oxidative stree in cardíac surgery. *Circ Journal.* 70:1169-73; 2006.

JEREMIC N et al. Effects of ischemia and omeprazole precondictioning on functional recovery of isolated rat heart. *Braz J Cardiovasc Surg*; 30:(2)266-75; 2015.

JIANG et al. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry* 202, 384-389, 1992.

JOHN BULLOCK, JOSEPH BOYLE & MICHAEL B.WANG. Fisiologia. National Medical Series. 3ª Ed. Guanabara Koogan. pp. 162-174; 1995.

KHALIL et al. Amelioration of Isoproterenol-Induced Oxidative Damage in Rat Myocardium by Withania somnifera Leaf Extract. *Biomed Res Int.* 2015:624159; 2015.

KRIEGER, J. E. Bases moleculares das doenças cardiovasculares: a integração entre a pesquisa e a prática clínica. São Paulo: Atheneu, cap. 35. 2008.

ARTIGOU et al. A double-blind randomised dose-effect trial of anisoylated plasminogen strept okinase activator complex (APSAC) in acute myocardial infarction. *Clin.Trials Meta-analys*. 28(6):317-328; 1993.

LAPAR et al. Is off-pump coronary artery bypass grafting superior to conventional bypass in octogenarians?. *J Thorac Cardiovasc Surg* 141(1):81-90, 2011.

LOWRY et al. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.

MADESH & BALASUBRAMANIAN. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics,* vol. 35, june 1998.

MANGOLIM et al Curcumin-β-cyclodextrin inclusion complex: stability, solubility, characterization by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. *Food Chem* 153:361-370. 2014.

HIGUERAS et al. Preparation and characterization of chitosan/HP-?-cyclodextrins composites with high sorption capacity for carvacrol. *Carbohydrate Polymers*, vol. 97, no. 2, pp. 262-268, 2013.

MENEZES et al. Solid-state β-cyclodextrin complexes containing geraniol, *Thermochim Acta.* 548, (45-50); 2012.

MENEZES, et al. Inclusion complex of (?)-linalool and β-cyclodextrin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2014.

MITROPOULOU et al. Composition, antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative activity of Origanum dictamnus (dittany) essential oil. *Microb Ecol Health Dis.* 2015.

MUKHERJEE et al. Phenolics and Terpenoids; the Promising New Search for Anthelmintics: A Critical Review. *Mini Rev Med Chem*. 2015.

NAGAOKA et al. A New Therapeutic Modality for Acute Myocardial Infarction: Nanoparticle-Mediated Delivery of Pitavastatin Induces Cardioprotection from Ischemia-Reperfusion Injury via Activation of PI3K/Akt Pathway and Anti- Inflammation in a Rat Model. *PLoS ONE* 10(7): e0132451. (2015).

NAGOOR MEERAN MF, JAGADEESH GS, SELVARAJ P. Thymol, a dietary monoterpene phenol abrogates mitochondrial dysfunction in β-adrenergic agonist induced myocardial infarcted rats by inhibiting oxidative stress. *Chem Biol Interact*. 244:159-68. 2016.

NARDELLO-RATAJ & LECLERCQ. Encapsulation of biocides by cyclodextrins: toward synergistic effects against pathogens. *Beilstein J. Org. Chem.* 10, 2603-2622; 2014.

PARANG et al. Metabolic modulators for chronic cardiac ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 10(4):217-23; 2005.

PRATIK et al. Induced Pluripotent Stem Cells for Post-Myocardial Infarction Repair Remarkable Opportunities and Challenges. *Circulation Research* April 11, 2014.

RAEDSCHELDERS et al. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther.* 133(2):230-55. 2012.

RINDLER et al. High dietary fat selectively increases catalase expression within cardiac mitochondria. *J Biol Chem.* 288(3):1979-90; 2013.

SANTOS et al. Characterization of carvacrol β-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. LWT - Food Sci. Technol. 60 : 583-592. 2015.

SANTOS, et al. Resposta ao exercício físico aeróbico tipo natação sobre o estado oxidativo cardíaco induzido por inalação de fumaça de cigarro em ratos Wistar. *Rev. Ciênc. Méd. Biol.*, Salvador, v. 13, n. 3 - especial, p. 355-362, set./dez. 2014.

SARRAZIN et al. Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from Lippia origanoides Kunth. *Lipids Health Dis*. 2015.

SEDLAAK, et al. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryly groups in tissue with Ellmam's reagent. *Anal Biochem*, v. 25, n.1, p. 192-205, 1968.

SERAFINI, et al. Interaction of p-cymene with β-cyclodextrin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry,* 2011.

SOBRAL et al. Antitumor Activity of Monoterpenes Found in Essential Oils. *The Scientific World Journal.* 2014.

SONG et al. Effects of Cyclosporine on Reperfusion Injury in Patients: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 287058, 6 pages; 2015.

SZEJTLI, J. Ciclodextrin complexed generic drugs are generally not bio - equivalent with the reference products: therefore the increase in number of marketed drug. *J Incl Phenom Macroc Chem*, 52, p. 1-11, 2005.

TUCCI, P. J. F. Pathophysiological Characteristics of the Post-Myocardial Infarction Heart Failure Model in Rats. *Rev Soc Bras Cardiol* 2011.

VEDANTHAN et al. Global Perspective on Acute Coronary Syndrome A Burden on the Young and Poor. *Circulation Research*, 2014.

WALTERS AM, PORTER GA JR, BROOKES PS. Mitochondria as a drug target in ischemic heart disease and cardiomyopathy. *Circ Res.* 111(9):1222-36; 2012.

WALTERS et al. Acute atrial stretch results in conduction slowing and complex signals at the pulmonary vein to left atrial junction: insights into the mechanism of pulmonary vein arrhythmogenesis. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 7(6):1189-97; 2014.

WANG et al. Febuxostat pretreatment attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via mitochondrial apoptosis. *J Transl Med* 13:209; 2015.

World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2014 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2014 [cited 2015 May 20]. 280p. Available from: http://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/en/

WU et al. Protective effect of picroside II on myocardial ischemia reperfusion injury in rats. *Drug Des Devel Ther*. 8:545-54. 2014.

XU et al. Lycopene Protects against Hypoxia/Reoxygenation Injury by Alleviating ER Stress Induced Apoptosis in Neonatal Mouse Cardiomyocytes. *PLoS ONE* 10(8): e0136443; 2015.

YU, LIU e ZHU. Carvacrol Protects against Acute Myocardial Infarction of Rats via Anti-oxidative and Anti-apoptotic Pathway. *The Pharmaceutical Society of Japan*. Vol. 36, No. 4. 2013.

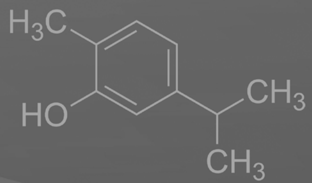
FRANCIELLE FEITOSA DIAS-SANTOS - Mestre em Ciências da Saúde pela Universidade Federal de Sergipe, bolsista CNPq (2016). Pós-Graduada emDisfagia e Fonoaudiologia Hospitalar, INCISA (2017). Graduada em Fonoaudiologia pela Universidade Federal deSergipe (2013). Pós-Graduada em Educação Especial: Deficiência Física UNIASSELVI (2020). Graduada emFisioterapia pela Faculdade Estácio de Sergipe (2017), Fisioterapeuta da Academia da Saúde - PrefeituraMunicipal de General Maynard (jan 2018 - fev 2020). Pós-Graduada em Fisioterapia em Terapia Intensiva noAdulto - Faculdade Estácio de Sergipe (2021-2023). Pós-Graduada em Fisioterapia em Oncologia - FAVENI (2021-2022). Fonoaudióloga clínica desde 2013 - atual nas áreas de DISFAGIA; linguagem e fala (TEA, TDAH, TDA,DEL); clínica da voz e voz profissional; fluência (gagueira infantil, neurogênica ou psicogênica e taquilalia);motricidade orofacial e reabilitação vestibular. Consultoria em Fonoaudiologia. Fonoaudióloga da PrefeituraMunicipal de Aracaju (fev 2019 -fev 2020; março 2022 - dezembro 2022) e da Prefeitura Municipal de NossaSenhora do Socorro (fev 2020 - jan 2022). Fisioterapeuta do Hospital Regional de Itabaiana (abril 2021-agosto2021) e do HUSE (abril 2022-janeiro 2023). Atuação nas áreas de Eletroterapia, Auriculoterapia Neurofisiológicae Aromaterapia. Atualmente estou como revisora ad hoc de periódicos científicos da revista internacionalCardiology Karger (dezembro 2018 - atual). Lattes iD: http://lattes.cnpq.br/3076363550817677. Orcid iD:https://orcid.org/0000-0002-7708-3815.

SANDRA LAUTON SANTOS. Doutorado em Bioquímica e Imunologia pela Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil(2007). Sub-Chefe do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe , Brasil.

ENILTON APARECIDO CAMARGO. Doutorado em Farmacologia pela Universidade Estadual de Campinas, Brasil (2007). Professor Associado I da Universidade Federal de Sergipe , Brasil.

EFEITO CARDIOPROTETOR DO COMPLEXO DE INCLUSÃO CARVACROL/BETACICLODEXTRINA NA LESÃO DE REPERFUSÃO CARDÍACA

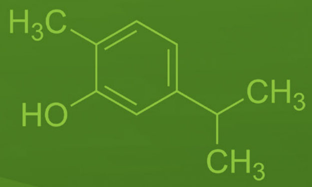
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br



Atena Editora
Ano 2023

EFEITO CARDIOPROTETOR DO COMPLEXO DE INCLUSÃO CARVACROL/BETACICLODEXTRINA NA LESÃO DE REPERFUSÃO CARDÍACA

www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br



Atena Editora
Ano 2023